

Vergleichende molekularepidemiologische Untersuchung porciner und humaner MRSA unter besonderer Berücksichtigung von Virulenzfaktoren

Catherine Hauck



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
Professur für Schweinekrankheiten
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

und dem

Universitätsklinikum Heidelberg
Department für Infektiologie
Krankenhaus- und Umwelthygiene

Betreuer: Prof. Dr. habil. Uwe Frank

**Vergleichende molekularepidemiologische Untersuchung
porciner und humaner MRSA unter besonderer
Berücksichtigung von Virulenzfaktoren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Catherine Hauck

Tierärztin aus Püttlingen

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Prof. Dr. habil. Uwe Frank

Prof. Dr. Christoph Lämmler

Tag der Disputation:

17.12.2014

Meinen Eltern

Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

ECCMID 2013

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ICC Berlin – Internationales Congress-Centrum Berlin vom 27.04.2013–30.04.2013

Genotyping MRSA: human and veterinary isolates differ greatly in expression of virulence factors

C. Hauck, N.T. Mutters, C. Bieber, G. Reiner, U. Frank (Heidelberg, Gießen, DE)

Poster Session: P1904



Diese Dissertation wurde gefördert durch ein Promotionsstipendium
der Hanns-Seidel-Stiftung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 Gattungsmerkmale	4
2.1.2 Zellwandaufbau	4
2.2 Biochemische Differenzierung	5
2.2.1 Kulturmorphologie	5
2.2.1.1 „Small Colony Variants“	6
2.2.2 Katalase- und Koagulasetestung	8
2.3 Molekularbiologischer Nachweis von MRSA	9
2.3.1 Aufbau und Sequenzierung der <i>SCCmec</i> -Kassette mit Nachweis des <i>mecA</i> -Gens	9
2.3.2 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)	13
2.3.3 <i>Spa</i> -Typisierung (Staphylokokken-Protein A Typisierung)	14
2.3.4 MRSA-Identifikation: MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spectrometry)	15
2.3.5 MRSA-Identifikation: Microarray	16
2.3.6 MRSA-Identifikation: Pastorex-Staph-Plus	16
2.3.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	16
2.4 Virulenzfaktoren	17
2.4.1 Exotoxine	18
2.4.1.1 Panton-Valentine-Leukozidin (PVL-Gen), Leukozidin-D/E (<i>lukD</i> -/ <i>lukE</i> -Gen) und Gamma-Hämolysin (<i>hlg</i> -Gen)	18
2.4.1.2 Hämolysine	20
2.4.1.2.1 Alpha-Hämolysin	20
2.4.1.2.2 Beta-Hämolysin (Shingomyelase C)	20
2.4.1.2.3 Delta-Hämolysin	20
2.4.2 Die Staphylokinase (<i>sak</i> -Gen), das Chemotaxis-inhibiting Protein (<i>chp</i> -Gen) und der Staphylococcal Complement Inhibitor (<i>scn</i> -Gen)	21
2.4.3 Accessory-Gen-Regulator (<i>agr</i> -Gen)	21
2.4.4 Pyrogenic toxins superantigens (PTSAg)	22

2.4.4.1 Die Enterotoxine und das Toxische Schock Syndrom Toxin-1 (<i>tsst1</i> -Gen)	22
2.4.4.2 Staphylococcal Superantigen-like Proteine	23
2.4.5 MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)	23
2.4.5.1 Protein A	24
2.4.5.2 Clumping Factor A und B (<i>clfA</i> -/ <i>clfB</i> -Gen)	24
2.5 MRSA bei Menschen und Tieren	28
2.5.1 Hospital-acquired Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> (HA-MRSA)	28
2.5.2 Community-associated MRSA (CA-MRSA)	29
2.5.3 Livestock associated MRSA (LA-MRSA)	31
2.5.3.1 Vorkommen und Evolution von LA-MRSA bei Schweinen, Personen mit Schweinekontakt	31
2.5.3.2 Rinder	38
2.5.3.3 Pferde	39
2.5.3.4 Esel	40
2.5.3.5 Geflügel	40
2.5.3.6 Kleintiere	41
2.5.3.7 Zootiere	42
2.6 Resistenzen	42
3. Material und Methoden	47
3.1 Projektaufbau	47
3.1.1 Schweinebetriebe	47
3.1.1.1 Nasentupfer von Schweinen und Umgebungsproben	47
3.1.1.2 Nasentupfer von Landwirten, Tierärzten und Studenten der Veterinärmedizin	48
3.1.1.2.1 Personenbezogene Datenerhebung mit Hilfe eines Fragebogens	48
3.1.1.3 Beprobte Schweinebetriebe mit Betriebsdaten	48
3.2 Schweineassoziierte Proben aus dem europäischen Ausland	57
3.3 Krankenhauspatienten	59
3.4 Probenentnahme und Transport	60
3.4.1 Nasentupfer der Schweine	60
3.4.2 Staubproben	60
3.4.3 Sockentupfer	61
3.4.4 Tränken	61

3.4.5 Spielzeuge	61
3.4.6 Landwirte, Tierärzte und Studenten	62
3.4.7 Probentransport	62
3.4.8 Krankenhauspatienten	62
3.5 Bakteriologische Untersuchung	63
3.5.1 Anzucht und Isolierung von MRSA	63
3.5.1.1 Nasentupfer der Schweine, Landwirte, Tierärzte, Studenten und die übersandten MRSA-Tupfer aus dem Ausland	63
3.5.1.2 Anzucht der Tränketupfer und Tupfer der beprobten Spielzeuge	64
3.5.1.3 Anzucht der Sockentupfer	64
3.5.1.4 Anzucht der Staubproben	65
3.5.1.5 Anzucht der MRSA von Krankenhauspatienten	65
3.5.1.6 Anzucht auf MRSA-ID und COS-Agar mit Auswertung	66
3.5.1.7 Hämolyseverhalten	67
3.6 Biochemische Differenzierung	68
3.6.1 Katalasetest	68
3.6.2 Pastorex Staph-Plus Test	68
3.7 Konservierung der MRSA	71
3.8 Molekularbiologische Differenzierung	72
3.8.1 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spectrometry)	72
3.8.1.1 Beladung des Metalltargets	72
3.8.1.2 MALDI-TOF Programmierung	73
3.8.1.3 MALDI-TOF Analyse	74
3.8.2 VITEK2	75
3.8.2.1 Beschreibung des VITEK2	75
3.8.2.2 Aufarbeitung der MRSA-Isolate	76
3.8.2.3 Interpretation und Auswertung der Ergebnisse des VITEK2	77
3.8.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)	78
3.8.3.1 Beschreibung der PCR-Methode zum Nachweis des <i>mecA</i> -, <i>femB</i> - und <i>nuc</i> -Gens der MRSA der Krankenhauspatienten	78
3.8.3.2 Nukleinsäureisolation aus den <i>S. aureus</i> Isolaten	79
3.8.3.3 Herstellung des Mastermixes	79

3.8.3.4 Extraktions- und Amplifikationskontrolle	80
3.8.3.5 Durchführung der PCR	81
3.8.3.6 Bewertung der Ergebnisse	81
3.8.4 Microarray	82
3.8.4.1 DNA Extraktion	83
3.8.4.2 Lineare Amplifikation mit Biotin-Markierung	85
3.8.4.3 Genotypisierung	85
3.8.4.3.1 Hybridisation	85
3.8.4.3.2 Erster Wasch-Schritt	86
3.8.4.3.3 Straptavidin-Horseradish-Peroxidase Verdünnung	86
3.8.4.3.4 Zweiter Wasch-Schritt	86
3.8.4.3.5 Farbreaktion	86
3.8.4.3.6 Analyse	87
3.9 Statistische Auswertung	88
4. Ergebnisse	89
<i>Teil I: MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben</i>	89
4.1 MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben	89
4.1.1 Anzahl positiver Betriebe: Herdenprävalenz	92
4.1.2 Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA	95
4.1.3 MRSA-Prävalenz bei Ferkeln, Absetzern, Sauen und Mastschweinen unterschiedlicher Altersklassen	97
4.2 MRSA-Prävalenz bei Landwirten, Tierärzten und Studenten	99
4.3 MRSA-Prävalenz von Umgebungsproben	102
4.4 MRSA-Vorkommen nach geographischer Verteilung	105
4.5 MRSA in unterschiedlichen Betriebsstrukturen	107
4.6 Angaben der Landwirte über Antibiotikagaben in ihrem Betrieb	109
<i>Teil II. Ergebnisse der MRSA-Anzucht</i>	112
4.7 Ergebnisse der MRSA-Anzucht der schweineassoziierten Proben: Anzucht, Katalase-, Pastorex-Staph-Plus Test, MALDI-TOF und Vitek2	112
4.8 MRSA der Krankenhauspatienten: Die Ergebnisse der PCR der Krankenhauspatienten	113
<i>Teil III. Vergleich humaner und porciner MRSA unter besonderer Berücksichtigung der Virulenzfaktoren</i>	114

4.9 Genotypisierung mittels Microarray	114
4.9.1 Genotyp der MRSA verschiedener Schweinealtersklassen	120
4.9.2 Genotyp der MRSA von Landwirten, Tierärzten und Studenten	120
4.9.3 Genotyp der MRSA aus Umgebungsproben	121
4.9.4 Genotyp der MRSA von Krankenhauspatienten	122
4.10 Das Vorkommen von Virulenzfaktoren und wichtigen Genen zur Genotypisierung	126
4.10.1 Das <i>mecA</i> - und <i>nuc</i> -Gen	126
4.10.2 Das Pantone-Valentine-Leukozidin (PVL-Gen)	126
4.10.3 Das Gamma-Hämolysin (<i>hlg</i> -Gen)	127
4.10.4 Das Gamma-Hämolysin, Alpha-Hämolysin, Beta-Hämolysin (Shingomyelase C) und Delta-Hämolysin (<i>hlg</i> -, <i>bla</i> -, <i>hbl</i> und <i>hld</i> -Gen)	128
4.10.5 Die Cassetten Chromosom Recombinase Gene (<i>ccr</i> -Gene)	129
4.10.6 Die Accessory-Gen-Regulator-Gene (<i>agr</i> -Gen)	135
4.10.7 Das Collagen-binding Adhesin (<i>cna</i> -Gen)	139
4.10.8 Potassium-translocating ATPase A und B (<i>kdpA</i> -, <i>kdpB</i> -Gen)	140
4.10.9 Leukocidin D und E (<i>lukD</i> - und <i>lukE</i> -Gen)	141
4.10.10 Die Staphylokinase (<i>sak</i> -Gen), das Chemotaxis-inhibiting Protein (<i>chp</i> -Gen) und der Staphylococcal Complement Inhibitor (<i>scn</i> -Gen)	143
4.10.11 Protein A (<i>spa</i> -Gen)	144
4.10.12 Das Fibrinogenbindungs-Protein (<i>fib</i> -Gen mit 19kDa)	144
4.10.13 Fibronectinbindendes Protein (<i>fnb</i> -Gen)	145
4.10.14 Das <i>Staphylococcus aureus</i> Oberflächenprotein G (<i>sag</i> -Gen)	147
4.10.15 Clumping-Faktor und Kapsel (<i>clf</i> - und <i>cna</i> -Gen)	148
4.10.16 Die Enterotoxine (<i>sea-sej</i> -Gene)	148
4.10.17 Das Toxin Schock Syndrom Toxin-1 (<i>tst1</i> -Gen)	150
4.10.18 Die Staphylococcal Superantigen-like Proteine 1-11 (<i>ssl1-11</i> -Gen)	150
4.10.19 MRSA des CC398 der Krankenhauspatienten	151
4.11 Die genotypisierten MSSA-Isolate	153
4.12 Die MRSA-Isolate aus Europa	154
4.13 Ergebnisse des Fragebogens	158
5. Diskussion	160
5.1 MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben	160

5.1.1 MRSA-Herdenprävalenz mit MRSA-Vorkommen nach geographischer Verteilung und MRSA-Prävalenz der Schweine	160
5.1.2 Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA	164
5.1.3 MRSA-Prävalenz bei unterschiedlichen Altersklassen: Ferkel, Absetzer, Mastschweine, Sauen und Deckeber	165
5.2 MRSA-Prävalenz bei Landwirten, Tierärzten und Studenten	166
5.3 MRSA Prävalenz von Umgebungsproben	168
5.4 MRSA in unterschiedlichen Betriebsstrukturen	169
5.5 Ergebnisse der MRSA-Anzucht	170
5.6 Genotypen der Isolate von Schweinen, Umgebungsproben, schweineassoziierten Menschen und der Krankenhauspatienten	172
5.7 Virulenzfaktoren und wichtigen Gene zur Genotypisierung	176
5.7.1 Das Pantone-Valentine Leukozidin (PVL-Gen)	176
5.7.2 Das Gamma-Hämolysin, Alpha-Hämolysin, Beta-Hämolysin (Shingomyelase C) und Delta-Hämolysin (<i>hlg</i> -, <i>bla</i> -, <i>hly</i> - und <i>hld</i> -Gen)	178
5.7.3 Die <i>SCCmec</i> und die „Cassetten Chromosom Recombinase Gene“ (<i>ccr</i> -Gene)	179
5.7.4 Die Accessory-Gen-Regulator-Gene (<i>agr</i> -Gen)	181
5.7.5 Potassium-translocating ATPase A und B (<i>kdpA</i> -, <i>kdpB</i> -Gen)	182
5.7.6 Leukocidin D und E (<i>lukD</i> -, <i>lukE</i> -Gen)	182
5.7.7 Staphylokinase (<i>sak</i> -Gen), Chemotaxis-inhibiting Protein (<i>chp</i> -Gen) und Staphylococcal Complement Inhibitor (<i>scn</i> -Gen)	183
5.7.8 Collagen-binding Adhesin (<i>cna</i> -Gen)	183
5.7.9 Fibrinogenbindungs-Protein (<i>fib</i> -Gen, <i>fib</i> -19kDa)	185
5.7.10 Fibronectinbindendes Protein (<i>fnaA</i> - und <i>fnaB</i> -Gen)	185
5.7.11 Das <i>Staphylococcus aureus</i> Oberflächenprotein G (<i>sag</i> -Gen)	186
5.7.12 Clumping-Faktor (<i>clfA</i> - und <i>clfB</i> -Gen) und Kapsel	186
5.7.13 Die Enterotoxine (<i>sea-sej</i> -Gen) und das Toxin-Schock-Syndrom-Toxin (<i>tst1</i> -Gen)	187
5.7.14 Staphylococcal Superantigen-like Proteine 1-11 (<i>ssl1-11</i> -Gen)	188
5.7.15 Vergleichende Darstellung der Virulenzfaktoren des ST398 aus Schweinebetrieben mit anderen MRSA sowie die Entwicklung der Aufnahme von neuen Virulenzfaktoren seit dem Jahr 2005	189
5.8 MRSA des CC398 der Krankenhauspatienten	194
5.9 MSSA	195

5.10 MRSA aus Europa	196
5.11 Auswertung der Fragebögen und Angaben der Landwirte zu Antibiotikagaben in ihrem Betrieb	197
6. Schlussfolgerung	199
7. Zusammenfassung	203
8. Summary	206
Literaturverzeichnis	209
Tabellenverzeichnis	293
Abbildungsverzeichnis	296
Anhang	299
Danksagung	302
Erklärung	303

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AB	Antibiotika
ACME	Arginine catabolic mobile element
<i>agr</i>	Accesory Gene Regulator-Gen
Amox.	Amoxicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
C.	Candida
ca.	Circa
CA-MRSA	Community aquired MRSA
<i>cap</i>	Kapsel-Gen
CC	Clonal Complex (mit Angabe der SCCmec gleichgesetzt vom Microarray mit dem ST z.B. CC398-I entspricht ST398-I)
<i>ccr</i>	Cassetten chromosom recombinase-Gen
CH	Schweiz
<i>chp</i>	Chemotaxis-inhibiting Protein-Gen
<i>clf</i>	Clumping Factor-Gen
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
<i>coa</i>	Koagulase-Gen

COS-Agar	Columbia 5% Sheep Blood Agar
CV	Core-Variablen-Genom
°C	Grad
d	Tag
DK	Dänemark
DNA	Desoxiribonuclein-Acid
Dr.	Doktor
<i>ent</i>	Enterotoxin-Gen
et al.	Et alii/ und andere
Fa.	Firma
Fc	Fragment crystallizable
<i>femA, femB</i>	Methicillinresistenzgene
<i>fib</i>	Fibrinogen-Gen
<i>fnb</i>	Fibronektin-Gen
GISA	intermediär Glycopeptid (Vancomycin) resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
h	Stunde
HA-MRSA	Hospital-acquired MRSA
<i>bla</i>	Hämolysin-Gen-alpha
<i>bld</i>	Hämolysin-Gen-delta
<i>hbb</i>	Hämolysin-Gen-beta
<i>hlg</i>	Hämolysin-Gen-gamma
I	Intermediär
ID	Identifizierung
IEC	Immune-Evasions-Cluster

Ig	Immunglobuline
IS	Insertionssequenz
<i>IsdB</i>	Iron surface determinant B
J	Junkyard regions
Ka	Keine Angaben
kDa	Kilo-Dalton
<i>kdp</i>	Potassium-translocating ATPase-Gen
kg	Kilogramm
KISS	Krankenhausinfektions-Surveillance-Systems
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
l	Liter
LA-MRSA	Livestock-associated MRSA
<i>luk</i>	Leukozidin-Gen
LW	Landwirt
<i>mecA</i> -Gen	Methicillinresistenz Gen-A
mg	Milligramm
MGE	Mobile genetische Elemente
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
min.	Minimum
ml	Milliliter
MLST	Multi-Locus-Sequence-Typing
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Gesamtzahl
NaCl	Natriumchlorid
NL	Niederlanden
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRW	Nordrheinwestfalen
NT-MRSA	Non-typeable-MSRA
<i>nuc</i>	Thermonuclease-Gen
OP	Operation
ORF	Open reading frame
<i>orfX</i>	<i>Open reading frame-Gen</i>
p	Signifikanz
PBP(2')	Beta-Lactam-resistentes Penicillin-Bindungs-Protein
PBP2a	Beta-Lactam-resistentes Penicillin-Bindungs-Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PMNs	Polymorphkernige Neutrophile
pmol	Pikomol
Proteine-S/-F	Slow- and fast-eluting proteins
PTSAg	Pyrogenic toxins superantigens
PVL	Panton-Valentine-Leucozidin
R	Resistent
rDNA	Ribosomale DNA

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
Rpm	Revolutions per minute
S	Sensibel
s.	Siehe
<i>sak</i>	Staphylokinase-Gen
SaPIs	Pathogenitätsinseln
<i>sar</i>	Staphylococcal accessory gene regulator-Gen
<i>sasG</i>	Staphylococcal OberflächenproteinG-Gen
<i>SCCmec</i>	Staphylococcal mec Kasette
Schw. assoziiert	Schweineassoziiert
<i>scn</i>	Staphylococcal Complement Inhibitor-Gen
SCV	Small Colony Variant
SE	Staphylokokken Enterotoxine
<i>sea-sei</i>	Staphylokokken Enterotoxin-Gene a–i
SFP	Staphylococcal food poisoning
SHT	Synergohymenotropische Toxine
SP	Spanien
<i>spa</i>	Staphylokokken-ProteinA-Gen
<i>Spp.</i>	Species pluralis
Ssl	Superantigen-like Proteine
<i>ssl1–10</i>	Gene der Staphylococcal Superantigen-like Proteine 1–10
St	Staub
ST	Sequenztyp

<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SW	Schwein
TA	Tierarzt
Tetra.	Tetracyclin
TNF-1	Tumor-Nekrose Faktor-1
TSST-1	Toxic shock syndrome Toxin-1
<i>tst1</i>	Toxic Schock Syndrom Toxin-1-Gen
u.a.	Unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
v.a.	Vor allem
VWF	Van-Willebrand-Faktor
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren hat das Auftreten von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen immer mehr zugenommen und auch im Bereich der Tiermedizin treten sogenannte Livstock-associated MRSA (LA-MRSA) vermehrt auf.

Es stellt sich die Frage, wie weit sich die LA-MRSA bis heute unter der Schweinepopulation verbreitet haben, da ihr Vorkommen bei Schweinen seit 2005 bekannt ist und meist über eine nasale Besiedelung mit dem Sequenztyp 398 (ST398) berichtet wurde. Jedoch kommt es bei den Schweinen selten zu klinischen Erscheinungen, weshalb die Kolonisation häufig unbeachtet bleibt.

So wurden in der vorliegenden Studie Schweine aus Baden-Württemberg, Hessen, Nordrheinwestfalen und Niedersachsen auf das Vorkommen von MRSA mit Nasentupferproben untersucht. Ebenso wurden die Umgebung der Schweine, die auf den Betrieben anwesenden Landwirte, Tierärzte und Tiermedizinstudenten beprobt und die isolierten MRSA mit MRSA von Krankenhauspatienten des Uniklinikums Heidelberg durch ein Microarrayverfahren zur Genotypisierung verglichen.

Dabei bestand ein besonderes Interesse daran, welcher Sequenztyp bei den beprobten Schweinen dominiert und ob die MRSA der Schweine auf Landwirte, Tierärzte und Tiermedizinstudenten übertragen und durch diese Personen in Krankenhäuser eingetragen werden können. Vor allem bei immunsupprimierten Menschen führen MRSA aufgrund ihrer Antibiotikaresistenz und den somit resultierenden schlechten Therapiemöglichkeiten zu schweren Infektionen und sogar zum Tode, sodass der Eintrag von LA-MRSA ins Krankenhaus besonders untersuchenswert ist. Um einen Vergleich mit anderen Ländern Europas zu haben, sollten noch MRSA-Isolate aus der Schweiz, Spanien, den Niederlanden und Dänemark von Schweinen, Landwirten und Umgebungsproben in die Studie mit einfließen.

Von großer Bedeutung war der Vergleich der Virulenzfaktoren der LA-MRSA mit den häufig in Krankenhäusern vorkommenden „Hospital-acquired MRSA“ (HA-MRSA) und den in der Bevölkerung verbreiteten „Community-acquired MRSA“ (CA-MRSA). Außerdem war die Analyse der bisher angenommenen Bedrohung, die ausgehend von den LA-MRSA für die Menschen besteht sowie von den HA- und CA-MRSA ausgehend für die Schweine, von großer Bedeutung. So blieb zu erforschen, ob die MRSA der Schweine sich seit ihrer Entdeckung vermehrt

ausgebreitet und neue Virulenzfaktoren von HA- oder CA-MRSA erworben haben, da bisher nur bei einer geringen Anzahl von MRSA-Isolaten des ST398 eine Analyse der Virulenzfaktoren durchgeführt wurde und meist nur die Hämolyse nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse können ein Hilfsmittel zur Einschätzung des Risikos für den Menschen darstellen, welches von LA-MRSA ausgeht, anhand der Analyse der Kolonisationsdynamik und der Übertragungsmöglichkeiten des dominierenden MRSA-Sequenztyps der Schweine sowie seiner Virulenzfaktoren.

2. Literaturübersicht

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein weltweit vorkommender fakultativ human- und tierpathogener Erreger. Schon im Jahre 1874 beschrieb der Chirurg Theodor Billroth, wie auch Robert Koch 1878, Staphylokokken als „Kugelmikrobien in Eiter“. Louis Pasteur brachte sie 1880 in Nährlösung zur Vermehrung. Die Namensgebung *Staphylococcus* (*S.*) wurde 1880 von dem schottischen Chirurgen Alexander Ogston geprägt. Eine erste Klassifizierung, auf Grund ihres Pigmentverhaltens, in *S. pyogenes aureus*, wegen ihrer goldenen Farbe und *S. pyogenes albus*, aufgrund des weißen Aussehens, erfolgte durch den Göttinger Chirurgen Friedrich Julius Rosenbach im Jahre 1884 (Gatermann 2009).

S. aureus tritt einerseits als asymptomatischer Besiedler von Haut und Schleimhäuten (BfR 2009), des Respirationstraktes, des Urogenitaltraktes und seltener des Verdauungstraktes von Menschen und Tieren auf (Quinn et al. 2002, Carter et al. 2004), gehört jedoch andererseits zu den bedeutendsten human- und tierpathogenen *S. spp.* (Biberstein et al. 1999, Hahn et al. 2001). Er verursacht oberflächliche und tief-invasive eitrige Infektionen, Sepsis, Endokarditis sowie Intoxikationen (Gatermann 2009). *S. aureus* besiedelt beim Menschen vor allem die vordere Nasenhöhle und kann in dieser ökologischen Nische häufig isoliert werden (Williams et al. 1963, Kluytmans et al. 1997). Etwa 20 % der Bevölkerung ist persistierend nasal von *S. aureus* besiedelt, während bei 30 % eine intermittierende Besiedelung vorliegt (Gordon et al. 2008).

In der Tiermedizin ist *S. aureus* v.a. als Erreger von Mastitiden beim Rind und bei Entzündungen des Bewegungsapparates beim Geflügel bekannt (BfR 2009). So wurden auch Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), zum ersten Mal im Jahre 1972, aus der Milch von an Mastitis erkrankten Rindern isoliert (Devriese et al. 1972, O'Mahony et al. 2005). Jedoch verursachen *S. aureus* Infektionen auch bei Schweinen Mastitis, Vaginitis und Metritis sowie Wundinfektionen, Abszesse, Omphalitis, Polyarthritits, neonatale Septikämie und wurden bei Schweinen mit Botrymycose nachgewiesen (Rich et al. 2005).

Zu einer Infektion mit *S. aureus* kommt es v.a. bei Ferkeln infolge von Immunsuppression, metabolischen und endokrinen Störungen oder Wunden, die zur Schwächung des Tieres führen und somit die Invasion des Erregers und seine Ausbreitung im Tier ermöglichen (Quinn et al. 2009). So führt *S. aureus* v.a. bei Ferkeln mit Nabelabszessen zu aufsteigenden Infektionen, die zu Polyarthritits und Septikämie führen (Quinn et al. 2002, Seibitz 2002, Henton 2004, Taylor 2006).

Der Erreger konnte auch aus abortierten Foeten und der Plazenta von Schweinen isoliert werden (Köhler et Wille 1980).

2.1.1 Gattungsmerkmale

Staphylokokken gehören zu der Gattung Micrococcaceae und sind gram-positive Kugelbakterien mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 μm (Schleifer et al. 1986). Die Bezeichnung Staphylokokken leitet sich von dem griechischen Wort „Staphyle“ ab, welches Traube bedeutet und bezieht sich auf die traubenförmige Anordnung im mikroskopischen Präparat.

Die Gattung der Staphylokokken gliedert sich in zahlreiche Spezies, von denen *S. aureus* durch die Bildung von freier Koagulase von den Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) diagnostisch getrennt werden kann (Gatermann 2009). Sie sind fakultativ anaerob, verstoffwechseln Kohlenhydrate fermentativ, bilden keine Sporen, sind unbeweglich und können bei Kochsalzgehalten von bis zu 10 % wachsen (Selbitz 2002, Bannermann et al. 2003, Selbitz 2007, Gatermann 2009). Aufgrund ihrer hohen Tenazität werden sie zu den widerstandsfähigsten Keimen der nicht sporenbildenden Bakterien gezählt (Selbitz 2007).

Merkmal	Ausprägung
Gramfärbung	Gram-positive Kokken
Aerob/anaerob	Fakultativ anaerob
Kohlenhydratverwertung	Fermentativ
Sporenbildung	Nein
Beweglichkeit	Nein
Katalase	Positiv
Oxidase	Negativ
Besonderheiten	Lysostaphin-Empfindlichkeit

Tabelle 1: Gattungsmerkmale von Staphylokokken (modifiziert nach Gatermann 2009).

2.1.2 Zellwandaufbau

Die Zellwand der Staphylokokken besteht aus einer 15 bis 80 nm dicken, vielschichtigen Peptidoglycanschicht, welche aus über Peptidketten verknüpftem N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure besteht. Die Peptidketten sind aus den Aminosäuren D-Alanin, D-

Glutaminsäure und Meso-Diaminopimelinsäure aufgebaut. Sie stellen mit der sich wiederholenden Abfolge von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure Angriffspunkte für Antibiotika dar. Außen ist der Zellwand eine dünne Schicht aus Polysacchariden, Teichonsäure und Proteinen aufgelagert (Hahn et al. 2001, Krüger al. 2007). Ein zellwandständiges Protein ist der Clumping Faktor, der als Rezeptor für Fibrinogen wirkt. Die meisten *S. aureus* Stämme bilden Protein A, das mit der Peptidoglycanschicht verbunden ist. Eine Kapsel aus Polymeren der Glukosaminuronsäure oder der Mannosaminuronsäure wird von einigen Stämmen von *S. aureus* gebildet (Gatermann 2009).

2.2 Biochemische Differenzierung

2.2.1 Kulturmorphologie

S. aureus ist ein widerstandsfähiges Bakterium und überlebt eine Hitzeeinwirkung von 60° C über einen Zeitraum von 30min sowie Kochsalzkonzentrationen von bis zu 10 % (Selbitz 2002, Gatermann 2009). Erst bei einem verlängerten Expositionszeitraum oder höheren Temperaturen wird *S. aureus* abgetötet (Gatermann 2009). *S. aureus* wächst bei Temperaturen zwischen 10 und 45 °C, mit einem Temperaturoptimum von 30 bis 37 °C, auf allen nicht-selektiven Nährmedien und bildet auf 5 % Schafblutagarplatten (Columbia 5 % Sheep Blood Agar/ COS-Agar 5 %), bei Bebrütung, innerhalb von 18 bis 24 Stunden mittelgroße, feuchte, weiße bis goldgelbe Kolonien mit Hämolyse. Diese kann in unterschiedlicher Intensität und mehrphasig auftreten (Quinn et al. 2002, Selbitz 2007, Becker et al. 2009). Durch die Produktion von Alpha-Hämolysin kommt es zu einer vollständigen Hämolyse, während die Bildung von Beta-Hämolysin zu einer großflächigen unvollständigen Hämolyse führt (Quinn et al. 2002).

Die *S. aureus*-Kolonien auf COS-Agar, lassen sich phänotypisch nicht von MRSA unterscheiden. Zur direkten Anzucht sowie zur weiteren Differenzierung müssen Selektivmedien verwendet werden. Dabei wird das Wachstum der Begleitflora durch die Zugabe von Kochsalz, Oxacillin und anderen Antibiotika unterdrückt (Kniehl 2006).

Zu den Selektivmedien gehören chromogene Agar (z.B. Chromagar MRSA II, BD, BBL-CHROMagar) oder NaCl-Mannitol Agar. Der Mannitol-Kochsalz-Agar nützt die hohe Kochsalztoleranz von *S. aureus* durch den Selektivzusatz von 7,5 % Kochsalz aus (Chaberny 2005).

Im Gegensatz zu konventionellen Kulturmedien ermöglichen chromogene Medien eine direkte Identifikation der Kolonien aufgrund ihrer Farbe (Malhotra-Kumar 2010). MRSA-verdächtige

Stämme wachsen auf CHROMagar (Chromagar MRSAII, BD) nach 24h Bebrütung bei 35-37 °C als mittelgroße, feuchte, rosa bis malvenfarbene Kolonien. Die Aktivität spezifischer bakterieller Enzyme wird hierbei durch die Farbänderung angezeigt. Das Wachstum von Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) und anderer Begleitflora wird mit Hilfe von Antibiotika-Zusätzen wie Oxacillin unterdrückt (Merlino et al. 2000, Diederer et al. 2005, Malhotra-Kumar et al. 2010).

2.2.1.1 „Small Colony Variants“

S. aureus tritt normalerweise im Wirt als extrazellulär proliferierender Erreger auf. Jedoch fiel schon früh auf, dass bestimmte chronisch-persistierenden Infektionen mit der Isolierung bestimmter phänotypischer *S. aureus*-Varianten assoziiert sind (Becker et Eiff 2006). Das winzige Wachstum als „Zwergkolonien“ wurde 1906 erstmals beschrieben (Kolle et al. 1906) und deshalb werden sie als „Small Colony Variants“ (SCVs) bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit der intrazellulären Persistenz (Von Eiff et al. 2003, McNamara et al. 2000, Becker et Eiff, 2006), weisen somit eine höhere Antibiotikaresistenz auf und werden vor dem Immunsystem geschützt (Balwit et al. 1994, Katl et al. 1998). SCVs von *S. aureus* stellen eine Subpopulation dar und weisen ein langsames Wachstum, mit einer um den Faktor sechs bis neun verlangsamten Generationszeit, auf. Sie sind nur nadelspitzgroß, oft unpigmentiert und bilden keine Hämolysezone aus (Von Eiff et al. 2003). Das langsamere Wachstum ist auf einen Auxotrophismus für Menandion und/oder Hämin zurückzuführen, die beide wichtig für den Elektronentransport sind. SCVs wachsen erst nach 48-72h Bebrütung auf soliden Nährmedien. Sie zeigen des Weiteren auch auf chromogenen Nährmedien oft nicht die typische Farbreaktion (Kipp et al. 2005).

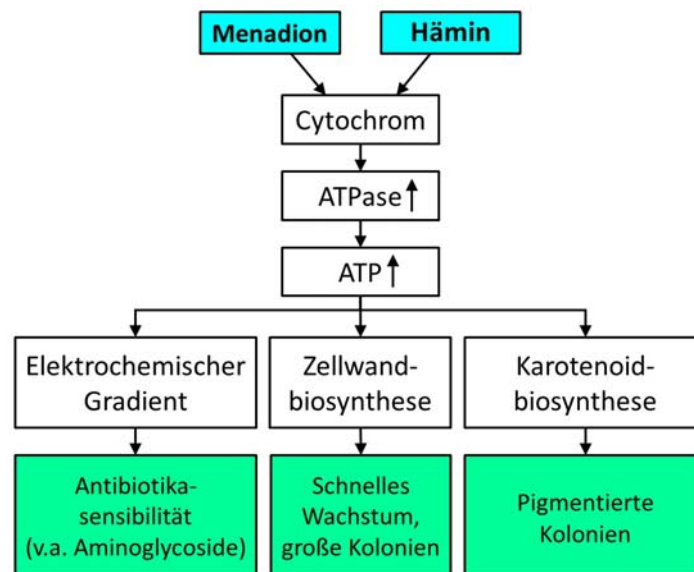


Abbildung 1: Model der metabolischen und energetischen Prozesse, die durch Menandion und Hämin gesteuert werden (modifiziert nach Proctor et al. 2006).

Auch die biochemischen Reaktionen, wie die Katalase- oder Koagulase-Testung, fallen bei SCV negativ aus. Somit werden sie oft in kommerziellen Identifizierungssystemen, wie dem VITEK2, nicht identifiziert oder mit KNS (Koagulase-negative Staphylokokken) verwechselt (Becker et al. 2004). Ein sicherer Nachweis der SCVs ist der Nachweis spezifischer Sequenzen, wie des Thermonuclease-Gens (*nuc*) oder des Koagulase-Gens (*coa*) (Brakstad et al. 1992, Schmitz et al. 1997, Becker et al. 2005). Nachweisen lassen sich SCVs auch mit dem Nachweis des Auxotrophismus des Hämin und Menandion, indem sie, auf festen Nährmedien nur um mit den Substanzen getränkte Plättchen wachsen (Van de Rijn 1980). SCVs sind oft resistenter gegenüber Antibiotika, v.a. Aminoglycosiden und Trimethoprim-Sulfonamiden und ihre Methicillinresistenz lässt sich nur mit der *mecA*-Gen PCR und dem PBP1alpha-Latex-Aglutinationstest nachweisen (Kipp et al. 2004, Becker 2006).

Merkmale	<i>S. aureus</i>	SCV- <i>S. aureus</i>
Größe	mittel	sehr klein
Pigmentierung	weiß-goldgelb	reduziert bis fehlend
Hämolysen	meist-beta Hämolysen	reduziert bis fehlend
	alpha-Hämolysen	
Wachstumsdauer	in 18-24h	in 48-72h
Antibiotikaresistenz	verschieden, je nach Isolat	Die Resistenz gegen Aminoglycoside und Trimethoprim-Sulfonamide ist erhöht
Koagulase-reaktion	positiv	verzögert oder negativ
Katalase-reaktion	positiv	verzögert oder negativ
Klinik	oft akut, bis chronisch	meist chronisch-persistierend

Tabelle 2: Vergleich des normalen *S. aureus* Phänotyps mit dem SCV-Phänotyp (modifiziert nach Becker et Eiff, 2006).

2.2.2 Katalase- und Koagulasetestung

Staphylokokken sind in der Lage das eisenhaltige Enzym Katalase zu bilden. Dieses schützt sie vor Sauerstoffradikalen und wird zur Speziesbestimmung herangezogen (Kniel et al. 2006). Des Weiteren bildet *S. aureus* das Enzym Koagulase und verfügt somit über einen Fibrinogenaktivator, der zur Bildung von Fibrin führt. Fibrin wird von *S. aureus* zur Oberflächenanheftung genutzt. Die Koagulase ermöglicht eine Differenzierung von *S. aureus* und den KNS (Foster 2002, Becker 2009). Dies geschieht, indem die Koagulase an Prothrombin bindet und der entstandene Komplex proteolytisch wirkt. Er löst direkt, durch Umgehung der Thrombinbildung, die

Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin aus. Auf diese Weise ist die freie Koagulase auch als Virulenzfaktor an der Bildung der Fibrinkapsel, um infizierte Läsionen herum, beteiligt. Der Koagulasenachweis mittels Kaninchenplasma dient als wichtiger Nachweis zur Speziesbestimmung von *S. aureus* (Bannermann 2003, Gattermann 2009).

2.3 Molekularbiologischer Nachweis von MRSA

2.3.1 Aufbau und Sequenzierung der *SCCmec*-Kassette mit Nachweis des *mecA*-Gens

Die Methicillinresistenz von *S. aureus* beruht auf dem Erwerb eines exogenen Genes, des *mecA*-Gens. Im Jahre 1987 wurde das *mecA*-Gen erstmals aus einem japanischen MRSA-Stamm geklont und analysiert (Matsushashi et al. 1986, Song et al. 1987). Es kommt sowohl bei *S. aureus* als auch bei KNS vor (Hurlimann-Delei et al. 1992, Suzuki et al. 1992) und codiert ein neues beta-Lactam-resistentes Penicillin-Bindungs-Protein (PBP), welches PBP2a oder auch PBP2` genannt wird. Das PBP2 kann im Gegensatz zu den PBP1-4, die Bindungsaffinität von beta-Lactam Antibiotika herabsetzen und die MRSA können so ihre Zellwandsynthese fortsetzen (Hartmann et al. 1984, Reynolds et al. 1985, Utsui et al. 1985, Matthews et al. 1990, Hiramatsu et al. 2001).

Das *mecA*-Gen liegt auf einem mobilen genetischen Element, das in das Staphylokokken Chromosom eingebaut wurde, der *SCCmec*-Kassette (*SCCmec*) (Song et al. 1987, Ito et al. 1999, Katayama et al. 2000) und wurde nahe dem chromosomalen Ursprungs für Replikation eingebaut (Kuroda et al. 2001, Baba et al. 2002).

SCCmec-Elemente besitzen vier charakteristische Eigenschaften. Sie tragen den *mec*-Gen Komplex (*mec*), der aus der Methicillin-Resistenz Determinanten *mecA* besteht, ihrer Regulationsgene und Insertionssequenzen. Sie sind Träger des *ccr*-Genkomplexes (cassetten chromosom recombinase), der aus *ccr*-Genen besteht, die für die Mobilität der Elemente, die die *SCCmec*-Kassette umgeben, verantwortlich sind. Die *ccr*-Gene, *ccrA* und *ccrB* sind für die Rekombinationsvorgänge, also die Integration und Exzision, der *SCCmec*-Kassette in und aus dem Genom heraus, verantwortlich (Katayama et al. 2000). Sie haben charakteristische, sich direkt wiederholende Nukleotidsequenzen und invertierende komplementäre Sequenzen an beiden Enden. *SCCmec*-Elemente tragen am 3`Ende ein „open reading frame“ (ORF) das *orfX* genannt wird.

Obwohl alle *SCCmec*-Elemente diese Eigenschaften besitzen, weisen sie allotypische Unterschiede auf, die für die *SCCmec*-Typisierung verwendet werden. Diese Unterschiede wurden bei den *ccr*-

und *mec*-Elementen gefunden. Bisher wurde über vier verschiedene *mec* und *ccr*-Klassen berichtet. Die *ccr*-Typen 1 bis 4 tragen die *ccrA*- und *ccrB*-Gene, welche zu 80 % identisch sind. Des Weiteren gibt es noch den Typ *ccrC* (Ito et al. 2001, Oliveira et al. 2001, Ma et al. 2002, Ito et al. 2004). *CcrC* kommt bei dem *SCCmec*-Typ V vor und kann sowohl die Integration und die Exzision, genau wie die *ccrA*- und *ccrB*-Gene selbstständig ohne deren Hilfe durchführen (Ito et al. 2004). Bisher wurden vier verschiedene Klassen des *mec*-Gen-Komplexes identifiziert, bei verschiedenen MRSA-Stämmen unterschiedlicher Spezies.

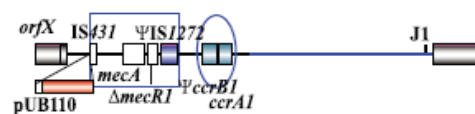
Diese sind die Klassen:

- A-*mec*, bestehend aus IS431*mec-mecA-mecR1-mecI*,
- die Klasse B-*mec*, bestehend aus IS431*mec-mecA-mecR1-IS1272*,
- die Klasse C-*mec*, aus IS431*mec-mecA-mecR1-IS431*
- und die Klasse D-*mec*, die aus IS431*mec-mecA-mecR1* besteht (Katayama et al. 2003).

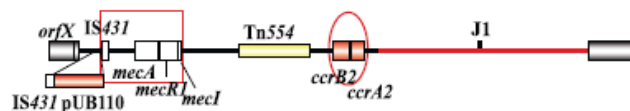
Die verschiedenen Typen der *SCCmec*-Elemente werden so mit Hilfe der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der *ccr*- und *mec*-Klassen definiert. Aufgrund dieser Kombinationsmöglichkeiten unterscheidet man sechs verschiedene Typen bei MRSA.

Bei der Einteilung kann noch zwischen „Junkyard regions“ (J) differenziert werden. Unterschieden werden mit J1, zwischen *ccr* und der rechten flankierenden Chromosomenregion, J2 als Region zwischen *mec* und *ccr* und J3 als Bereich zwischen *orfX* und *mec*. Jedoch sind die J-Regionen nicht immer spezifisch für jeden *SCCmec*-Typen (Ma et al. 2002, Hisata et al. 2005, Kwon et al. 2005, Shore et al. 2005).

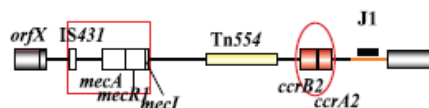
Type I.1



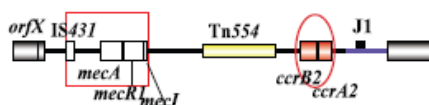
Type II.1



Type II.2



Type II.3



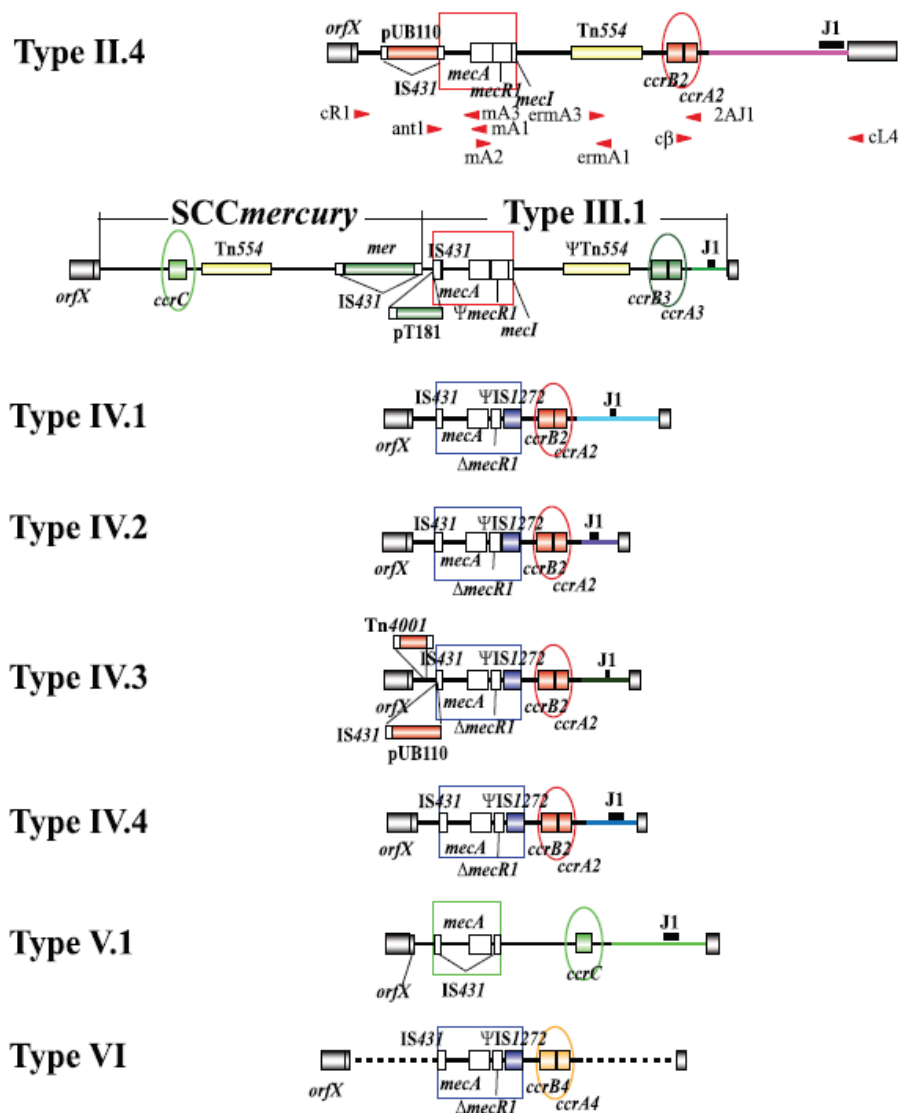


Abbildung 2: *SCCmec* Typen (nach Kondo et al. 2006).

Bei HA-MRSA treten v.a. die *SCCmec* Typen I-III auf, während bei CA-MRSA der *SCCmec* Typ IV und V und bei LA-MRSA die Typen IV und V gefunden werden (Ito et al. 2001, Daum et al. 2002, Enright et al. 2002, Vandesch et al. 2003, De Neeling et al. 2007, Cohn et al. 2010).

Als Goldstandard des *mecA*-Nachweises gilt die PCR (Polymerase-Chain-Reaction) (Geha et al. 1994, Barski et al. 1996, Bignardi et al. 1996, Salisbury et al. 1997, Kolbert et al. 1998).

So kann zur Identifikation von MRSA z.B. eine Multiplex-PCR herangezogen werden (Domann et al. 2000), die der Detektion des 16S-rRNA Gens der Staphylokokken, des *mecA*-Gens und des für *S. aureus*-spezifischen Nukleasogens (*nuc*) dient (Louie et al. 2002, Maes et al. 2002, Elsayed et al. 2003, Fang et al. 2003, Poulsen et al. 2003). Genauso kann der Nachweis des *mecA*-Gens (Ünal et al. 1992), des für *S. aureus* spezifischen *femA*-Gens und des Staphylokokken-Insertion-

Elementes IS431, das als interne Kontrolle für potentiell falsch-negative Ergebnisse dient, zur gleichzeitigen Speziesbestimmung und phänotypischen Resistenznachweises, mittels multiplex PCR, herangezogen werden (Barberis-Maino et al. 1987).

Das *mecA*-Gen kann auch mit Hilfe der multiplex real-time PCR nachgewiesen werden, indem sein Nachweis zusammen mit dem für *S. aureus*-spezifischen *orfX*-Gens erfolgt (Aires et al. 2000, Huletzky et al. 2004).

So kann durch den gleichzeitigen Nachweis des *mecA*-Gens zusammen mit für *S. aureus*-spezifischen Genen, wie dem *femA*-Gen, dem *nuc*-Gen oder dem *orfX*-Gens, falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden (Unal et al. 1992, Vannuffel et al. 1995, Maes et al. 2002, Poulsen et al. 2003, Huletsky et al. 2004).

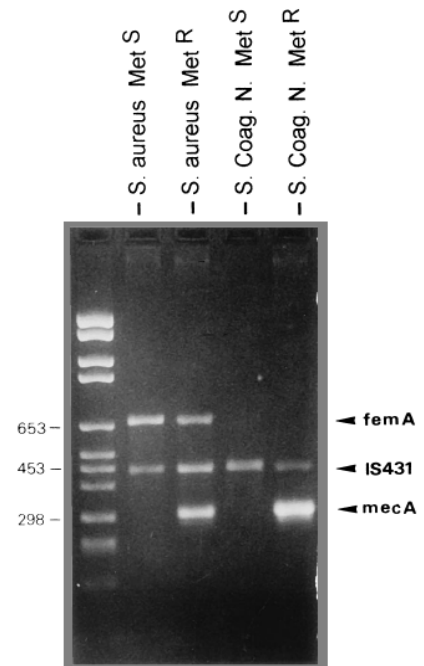
Auch Multiplex-real-time PCRs zum gleichzeitigen Nachweis des *mecA*-Gens, des *nuc*-Gens, des Toxic shock syndrome Toxins 1 (TSST-1) und des *lukS*-PV (Panton-Valentine Leukozidin, PVL) (Limbagio et al. 2009) sowie des *mecA*-Gens zusammen mit dem spezifischen Genom Fragment sa442 oder dem *femB*-Gen existieren (Domann et al. 2000, Reischl et al. 2000, Shrestha et al. 2002).

Mit diesen PCR-Methoden können MRSA aber nicht in gemischten Bakterienkulturen, wie aus Direktausstrichen der vorderen Nasenhöhle, von KNS mit *mecA*-Gen unterscheiden werden (Warren et al. 2004). Jedoch gibt es zum MRSA-Nachweis, real-time PCR Methoden, wie IDI-MRSA (Infection Diagnostic, Inc., Sainte-Foy, Québec, Canada) die MRSA mittels *SCCmec* Kassette (Ito et al. 1999) und des für MRSA-spezifischen *orfX*-Gen auch aus gemischten Bakterienkulturen nachweisen können.

Zur MRSA-Identifizierung können weitere Methoden angewendet werden die auch auf dem *mecA*-Nachweis beruhen. So gibt es z.B. die „Slide latex agglutination assays“ die das PBP2` nachweisen, welches vom *mecA*-Gen codiert wird (Bakkaoui et al. 1999, Van Leeuwen et al. 2002, Louie et al. 2002).

Direkte oder indirekte „particle agglutination assays“ verwenden anti-PBP2` Antikörper (Cavassini et al. 1999, Hussain et al. 2000, Rohrer et al. 2001) und werden auch nur in *S. aureus* Reinkulturen eingesetzt (Cavassini et al. 1999, Wiolders et al. 2001).

Abbildung 3: Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten, die durch Multiplex-PCR entstanden sind. Sie weisen das typische Bandenmuster von MRSA, MSSA und Methicilin- resistenten sowie sensiblen KNS auf (nach Vannuffel et al. 1995).



2.3.2 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Das MLST dient der Typisierung von MRSA (Enright et al. 2000) beruhend auf den Sequenzen von ca. 450bp (Basenpaaren), von sieben sogenannten Housekeeping Genen. Von jedem der Housekeeping-Gene wird ein Allele-Profil erstellt und so der Sequenz-Typ (ST) ermittelt. Für jedes Genfragment werden die Allele bestimmt und somit kann jedes Isolat, durch die Bestimmung der Allele der sieben Housekeeping Gene definiert werden. Dieses entspricht dem Allele Profil, also dem Sequenztyp (ST). Die Sequenzen dieser Gene werden mit bekannten Allelen jedes Genlocus, mit Hilfe der MLST Website, <http://www.mlst.net> verglichen. Dort ist jedes Isolat beschrieben durch ein sieben Allele Profil, das den Sequenztyp definiert (Maiden et al. 1998, Enright et al. 2000, Robinson et al. 2004).

Da jedes der sieben Housekeeping Gene über viele verschiedene Allele verfügt, ist es unwahrscheinlich, zufällig gleiche Alleleprofile zu erhalten. Deshalb können Isolate mit dem gleichen Alleleprofil dem gleichen MRSA-Klon zugeordnet werden (Maiden et al. 1998, Feil et al. 1999). Bei den „sieben polymorphen Housekeeping Genen“ handelt es sich um das *arcC*-, *aroE*-, *glpF*-, *gmk*-, *pta*-, *tpi*- und *yqiL*- Gen von *S. aureus* (Enright et al. 2000, www.eburst.mlst.net, www.mlst.net).

Gen	Sequenzlänge (bp)	Alleleanzahl
<i>arcC</i>	456	19
<i>aroE</i>	456	23
<i>glpF</i>	456	14
<i>gmk</i>	429	13
<i>pta</i>	474	18
<i>tpi</i>	402	18
<i>yqiL</i>	516	19

Tabelle 3: Sequenzvariationen der sieben Housekeepinggenen (modifiziert nach Enright et al. 2000).

Das MLST kann auch mit Hilfe von DNA-Array Technologien durchgeführt werden. Die Oligonucleotide der MRSA werden auf dem Gen-Chip immobilisiert. Dabei wird jedes einzelne Nucleotid dieser Probe gescannt, das passende Allel jedes Housekeeping-Genes wird identifiziert und schließlich wird jedes Allel Profil von jedem Isolat definiert. So kann der DNA-Array jeder MRSA-Probe den passenden Sequenztyp zuordnen (Van Leeuwen et al. 2003).

2.3.3 *Spa*-Typisierung (Staphylokokken-Protein A Typisierung)

Die *spa*-Typisierung ist eine molekularbiologische Methode zur Erkennung von Zusammenhängen zwischen verschiedenen MRSA-Isolaten mit nur einer Gensequenz, also ein „Single Locus Sequence Typing“ (Frénay et al. 1996, Hasman et al. 2010).

Das Protein A-Gen, bzw. sein codierendes *spa*-Gen, enthält ca. 2150bp und verfügt über viele verschiedene funktionelle Regionen. Es besitzt die Fc-Bindungsregion und die sogenannte X-Region, die auch „Repeat-Region“ genannt wird, an seinem C-Terminus (3'-Terminus). Sie ist für die Zellwandanheftung verantwortlich (Schneewind et al. 1992). Die Fc-Bindungsregion besteht aus fünf 160bp langen Wiederholungen, während die X-Region über eine variable Anzahl von 3 bis 15 Wiederholungen, mit meist 24bp, verfügt (Guss et al. 1984, Uhlén et al. 1984).

Sie ist hochgradig polymorph, da die Anzahl und Sequenz jeder Wiederholung zwischen den verschiedenen MRSA-Stämmen variiert. In unveröffentlichten Studien wurden 25 verschiedene Wiederholungen entdeckt, die meistens 24bp enthielten. Um die Erstellung der *spa*-Typen zu erleichtern, wurde jeder Wiederholung ein einziffriger Buchstabencode zugeordnet. Mit Hilfe einer PCR kann eine Amplifikation der „X-Region“, mit Primern wie *spa1113f* (5'-

AAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3') und *spa* 1514r (5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3') durchgeführt und mittels Sequenzierung der *spa*-Typ des Isolates bestimmt werden. Dieser Vergleich der Basenpaarmuster der „X-Region“ ermöglicht das MRSA-Isolat einem der bisher über 1200 verschiedenen *spa*-Typen zuzuordnen. Die Variation an *spa*-Typen ist auf Punktmutation, Deletion und Duplikation der „polymorphen Region X“ zurückzuführen (Frénay et al. 1996, Shopsin et al. 1999, Kahl et al. 2005, Deurenberg et al. 2006, Deurenberg et Stobberingh 2008, Hasman et al. 2009). So können mehrere *spa*-Typen, wie t011, t034 und t108, dem ST398 zugeordnet werden, der deren übergeordneter MLST-Typ (ST) ist und am Häufigsten bei Nutztieren vorkommt (Stommenger et al. 2006, Neeling et al. 2007, Van Loo et al. 2007, Witte et al. 2007, Deurenberg et Stobberingh 2008).

2.3.4 MRSA-Identifikation: MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spectrometry)

Der MALDI-TOF wird zur Identifizierung von Erregern mit Hilfe ihrer charakteristischen Proteinspektren eingesetzt. Dabei wird der Erreger im Hochvakuum mit Laserstrahlen zertrümmert und die Proteintrümmer in einem elektrischen Feld beschleunigt. So entsteht ein Spektrum, das mit der MALDI-TOF-Datenbank verglichen (Standartarbeitsanweisung: Bode, Burckhardt 2008) und für die Typisierung von Mikroorganismen mittels Massenspektrometrie erfolgreich eingesetzt werden kann (Fenselau et al. 1994, Drucker et al. 1994). Dubois et al. identifizierten 151 von 152 Staphylokokken Stämmen (99,3 %), die zuvor mittels *sod-A* Gen basiertem Oligonucleotid Array schon identifiziert wurden, auch mit dem MALDI-TOF richtig (Giammarinaro et al. 2005, Dubois et al. 2010). Auch in einer vorherigen Studie mit den gleichen Stämmen versagte der MALDI-TOF nur bei einem Staphylokokkenstamm, während der VITEK2 16 Stämme der falschen Spezies zuordnete (Delmas et al. 2008).

Der MALDI-TOF ist eine schnelle Methode zur Stamm- und Spezieserkennung und hat im Gegensatz zur *mecA*-PCR nicht den Nachteil bei KNS mit *mecA*-Gen oder manchen phänotische Methicillin-sensitiven *S. aureus* Stämmen, Fehler zu machen (Kobayashi et al. 1994, Salisbury et al. 1997).

2.3.5 MRSA-Identifikation: Microarray

Der Microarray basiert darauf die DNA von MRSA-Isolaten mittels einer DNA-Chiptechnologie zu genotypisieren (Monecke et al. 2003, Korzak et al. 2005, Monecke et al. 2005), die Spezies zu bestimmen und somit auf Virulenzgene, Resistenzgene und Toxine hin zu untersuchen (Williams et al. 2000, Jarraud et al. 2002, Fitzgerald et al. 2003, Lina et al. 2004, Robinson et al. 2005, Monecke et al. 2008). Eine *SCC_{mec}*-Typisierung und Erkennung von Kapselantigenen sowie Allelvarianten von MSCRAMM (Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) wird ebenfalls vom Microarray durchgeführt. Der Nachweis beruht auf einer Amplifikation und Markierung von Zielgenen aus der DNA des zu untersuchenden Isolates. Die modifizierten einzelsträngigen DNA-Moleküle werden gegen eine Vielzahl, an spezifischer DNA-Sonden hybridisiert (Monecke et al. 2008a).

2.3.6 MRSA-Identifikation: Pastorex-Staph-Plus

Der Pastorex Staph-Plus (Pastorex Staph-Plus; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) ist ein Latex-Agglutinationstest, zur weiteren Differenzierung von Staphylokokkenkolonien mit gleichzeitigen Nachweis des Clumping-Faktors, des Protein A und der spezifischen Kapselpolysaccharide 5 und 8, als wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus* (Fournier et al. 1993, Compennolle et al. 2007, Verdier et al. 2007). Allerdings führen *S. lugdunensis* und *S. schleiferi* zu falsch-positiven Ergebnisse, da sie Clumping-Faktor produzieren (Kloos et al. 1999) und *S. haemolyticus* führt ebenfalls aufgrund seiner Produktion von Kapselpolysacchariden des Types 8, zu falsch-positiven Ergebnissen (Fournier et al. 1993, Davies et al. 1997, Wichelhaus et al. 1999).

2.3.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE beruht auf der Verdauung der bakteriellen DNA durch Restriktionsenzyme. Bei MRSA wird normalerweise *SmaI* als Endonuclease zur MRSA-Verdauung verwendet (Bens et al. 2006). Die entstandenen Genfragmente werden mittels Gelelektrophorese, anhand ihrer verschiedenen Größen und Molekulargewichte aufgetrennt und sichtbar gemacht. Dabei entstehen verschiedene Bandenmuster bei genetischen Unterschieden (Bens et al. 2006, Fetsch et al. 2009).

LA-MRSA, wie der ST398, können mit dem *SmaI*-Restriktionsenzym nicht verdaut werden, da sie ein Restriktionsmodifikationsenzym besitzen (Bens et al. 2006, Arguidin et al. 2009). Dieses führt

zur Methylierung der Bindungsstellen des Enzyms *SmaI*, durch die 5-Methyl-Cytosin-methyltransferase, welche die Sequenz CmCNGG am zweiten Cytosin verändert und somit zur nicht Typisierbarkeit der LA-MRSA mit diesem Enzym führt (Arguidin et al. 2009, Bens et al. 2006, Corina et al. 2006). Die DNA kann nicht mehr geschnitten werden, da *SmaI* nicht mehr an seine Bindungsstelle ansetzen kann. Wegen ihrer nicht Typisierbarkeit werden sie auch als „non-typeable“ MSRA bezeichnet (NT-MRSA) (Bens et al. 2006). Somit war ein Vergleich der NT-LA-MRSA-Isolate mit den durch *SmaI* schneidbaren und typisierbaren MRSA-Isolaten nicht möglich (Arguidin et al. 2009).

Jedoch können LA-MRSA-Isolate mit dem Neoschizomer *Cfr91*, des *SmaI*, gespalten werden (Fanoy et al. 2009, Bhat el al. 2009). *Cfr91* setzt zwar an der gleichen Sequenz wie *SmaI* an schneidet aber eine andere Position dieser Sequenz. Die PFGE mit dem Neoschizomer *Cfr91* ermöglicht auch einen Vergleich zu den mit *SmaI* typisierbaren Isolaten. Somit kann die DNA verschiedener MRSA-Stämme mit dem ST398 verglichen werden (Argudin et al. 2010).

Mit Hilfe des Neoschizomer *Cfr91* konnte auch gezeigt werden, dass die *spa*-Typen t011, t034 und t108, die häufig bei dem ST398 vorliegen, in der PFGE eine weitaus größere Diversität besitzen als in der *spa*-Typisierung oder im MLST zu erkennen ist (Bosch et al. 2010).

Auch die Enzyme *Apal* und *EagI* ermöglichen die PFGE des ST398, jedoch können sie nicht mit den Banden von MRSA verglichen werden, die durch *SmaI* entstehen (Witte et al. 2007, Kadlec et al. 2009, Rasschaert et al. 2009, Smith et al. 2009). Das Neoschizomer *XmaI*, das an der gleichen Stelle wie *SmaI* erkennt und an einer anderen Position schneidet, führt nur zur unvollständigen Verdauung ohne Vergleichbarkeit zu den *SmaI*-Banden (Bens et al. 2006, Arguidin et al. 2009).

2.4 Virulenzfaktoren

Das Virulenzpotential von *S. aureus* beruht v.a. in der Fähigkeit das Immunsystem zu umgehen und Toxine zu bilden (Foster et al. 2005, De Leo et al. 2009). Die Exotoxine, wie Hämolysine, Leukozidine, Nucleasen, Proteasen, Lipasen, Hyaluronidasen, Elastasen, Kollagenasen und die Staphylokinase dienen der Bereitstellung von Nährstoffen und der Ausbreitung der *S. aureus* im Gewebe (Dinges et al. 2000).

2.4.1 Exotoxine

2.4.1.1 Panton-Valentine-Leukozidin (PVL-Gen), Leukozidin-D/E (*lukD*-/*lukE*-Gen) und Gamma-Hämolysin (*hlg*-Gen)

Das PVL ist ein Zytotoxin, das zu Leukozytenzerstörung und Gewebnekrosen führt und meistens bei CA-MRSA isoliert wird (Vandenesch et al. 2003, Witte et al. 2007, Yu et al. 2008). Das hohe Virulenzpotential der CA-MRSA wird mit PVL-assoziiert und von den Genen *lukF*-PV und *lukS*-PV, die die beiden Untereinheiten des PVL bilden, codiert (Gillet et al. 2002, Vandenesch et al. 2003). Es wird von weniger als 5 % der *S. aureus* Stämme produziert (Lina et al. 1999) und seine Produktion steht meist in Verbindung mit Furunkulose, Hautabszessen, nekrotischen Hautinfektionen und Pneumonien, die häufig zum Tode führen (Cribier et al. 1992, Couppié et al. 1994, Morgan et al. 2007). Im Gegensatz zu dem PVL führen die Leukozidine D und E nur zu Hautinfektionen und Abszessen und nicht zu nekrotisierenden Pneumonien (Morgan et al. 2007).

Das PVL gehört zusammen mit γ -Hämolysin und anderen Leukotoxinen, wie den Leukozydinen D und E, zur Familie der synergohymenotropischen Toxine (SHT), die aufgrund der Zusammenarbeit von zwei Proteinen wirken und Poren bilden (Supersac et al. 1993, Prévost et al. 1995). Diese Toxine schädigen die Membrane der polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs), Monozyten und Makrophagen durch die sekretorischen, ionenkanalbildenden Proteine S und F (Slow- and fast-eluting proteins). Die γ -Hämolysine schädigen zusätzlich noch die Erythrozyten (Woodin et al. 1959, Woodin et al. 1960, Prévost et al. 1994).

Das γ -Hämolysin wird von mehr als 99 % der isolierten *S. aureus*-Stämme gebildet und ist auch ein bikomponentes Toxin (Smith et al. 1983, Guyonnet et al. 1970, Taylor et al. 1974, Plommet et al. 1988, Cline et al. 1992), genau wie das PVL (Panton et al. 1932, Gladstone et al. 1957, Woodin et al. 1972, Ward et al. 1980, Finck-Barbancon et al. 1991). Die Aktivität von γ -Hämolysin beruht auf der Aktivität der Proteine, die von folgenden Genen codiert werden: *hlgA* und *hlgC*, die zur Klasse S gehören und *hlgB* das zur Klasse F gehört. So können zwei S+F Paare gebildet werden *hlgA+hlgB* sowie *hlgC+hlgB* (Prévost et al. 1995). Alle PVL produzierenden Isolate bilden *lukS*-PV und *lukF*-PV. Diese beiden Paare sind leukotoxisch während die beiden γ -Hämolysin-Paare sowohl leukotoxisch sind als auch zur Lyse von Erythrozyten führen (Finck-Barbancon et al. 1993, Prévost et al. 1994, Lina et al. 1999).

Nach ihrer Sekretion wird die S-Komponente von PVL an den Kalzium Kanal der Zellmembran von polymorphkernigen Zellen gebunden. Dann bindet die F- an die S-Komponente, induziert

die Öffnung des Kalzium-Kanals mit Kalziumeinstrom sowie dem Einstrom anderer zweiwertiger Kationen. Der daraus resultierende gleichzeitige Einbau der beiden Komponenten S und F in die Zellmembran, unter Bildung eines Heptamers führt zur Ausbildung von Poren die weit genug sind um einen gleichzeitigen Ethidiumeinstrom zu ermöglichen (Staali et al. 1998).

Des Weiteren beschrieben Kaneko et al. nach Bindung der S-Komponente eine Phosphorylierung, durch eine Proteinkinase, mit Induktion von Kalziumkanälen (Kaneko et al. 2004). Der Ionenstrom führt auch zur Degranulation der PMNs (Colin et al. 1994, Meunier et al. 1995) und zum Freiwerden von Entzündungsmediatoren (Hensler et al. 1994, König et al. 1995).

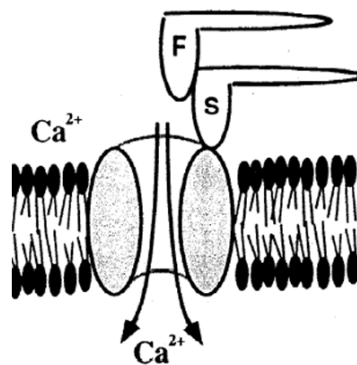


Abbildung 4: Aktivität der S- und F-Komponenten von SHT in der Zellmembran von PMNs (nach Staali et al. 1998).

Eine mit PVL versetzte Injektion führt bei Kaninchen zu schweren Entzündungsreaktionen und bei intradermaler Gabe, zur kapillären Dilatation, Chemotaxis, Infiltration von PMN, Karyorrhexis der PMN und Hautnekrosen (Ward et al. 1980, Prévost et al. 1995a). Das γ -Hämolysin führt, im Kaninchenmodell, zwar zu Entzündungsreaktionen aber nicht zu Hautnekrosen (Hensler et al. 1994, König et al. 1995).

Bei CA-MRSA kann es im Unterschied zu HA-MRSA zur Integration der Bakteriophage phiSLT, die Träger des PVL-Gens ist, in das Genom durch horizontalen Gentransfer kommen (Boyle-Vavra et Daum 2007). Die CA-MRSA verfügen über eine kleinere *SCCmec* Kasette als HA-MRSA und meistens die *SCCmec* Typen IV und V (Vandenesch et al. 2003, Diep et al. 2006). Die *SCCmec* Typen IV und V kommen auch bei porcinen MRSA am häufigsten vor und somit könnte der Bakteriophage auch in diese eingebaut werden (Boyle-Vavra et Daum 2007, Welinder-Olsson 2008). Die phiSLT Phage, die Träger des *lukS*- und *lukF*-Gens ist, kann MSSA befallen. Wenn dann noch eine *SCCmec* Kasette vom Typ IV oder V, horizontal in das MSSA Genom

übertragen wird kommt es zur Ausbildung virulenter CA-MRSA mit PVL (Boyle-Vavra et Daum 2007).

2.4.1.2 Hämolysine

2.4.1.2.1 Alpha-Hämolysin

Das alpha-Hämolysin wirkt hämolytisch, neurotoxisch und nekrotisch (Freer et al. 1983). Es wird vom *hla*-Gen (Alpha-Hämolysin Gen) codiert und vom der *agr*-Gruppe (Accessory Gene Regulator) kontrolliert (Gray et al. 1984, O'Reilly et al. 1990).

Die Monomere des alpha-Hämolysins lagern sich in der Zellmembran zu Heptameren zusammen und führen zur Zellyse (Belmonte et al. 1987, Mellor et al. 1988, Gouaux et al. 1994, Valeva et al. 1997). Bei geringen Konzentrationen an alpha-Hämolysin bildet es an spezifische Rezeptoren der Zellmembran während es bei hohen Konzentrationen unspezifisch, zur Porenbildung, an die Zellmembran bindet (Hildebrand et al. 1991). Die Porenbildung führt zum Kalium Efflux, zum Efflux anderer kleiner Ionen sowie zum Natrium und Kalzium Einstrom. Dies führt zur osmotischen Schwellung der Zelle und schließlich zur Zellruptur (Dinges et al. 2000).

2.4.1.2.2 Beta-Hämolysin (Shingomyelase C)

Das beta-Hämolysin wird v.a. von *S. aureus* Isolaten tierischer Herkunft isoliert und führt wahrscheinlich zu einem selektiven Vorteil dieser Isolate, da die genaue Funktion noch ungeklärt ist (Bernheimer et al. 1974, Freer et al. 1983, Dinges et al. 2000). Es wird vom *hlb*-Gen codiert, enthält Sphingomyelinase und wirkt verstärkt gegen bovine und ovine Erythrozyten (Yamada et al. 1988).

2.4.1.2.3 Delta-Hämolysin

Das Delta-Hämolysin wird von 97 % der *S. aureus* Stämme gebildet und über einen Accessory Gene Regulator kontrolliert (Birbeck et al. 1988, Dhople et al. 1993). Es ist fähig die Lyse von Erythrozyten und weiterer Zellen und Organellen wie, Spheroplasten und Protoplasten, zu verursachen (Freer et al 1982). Das delta-Hämolysin bildet eine alpha-Helix Struktur, mit einer hydrophoben und hydrophilen gegenüberliegenden Domäne aus und zerstört so die Zellmembran (Freer et al. 1982, Lee et al. 1987).

2.4.2 Die Staphylokinase (*sak*-Gen), das Chemotaxis-inhibiting Protein (*chp*-Gen) und der Staphylococcal Complement Inhibitor (*scn*-Gen)

Die sekretorischen Virulenzfaktoren wie der Staphylococcal Complement Inhibitor-Gen und das Chemotaxis-Inhibiting Protein von *S. aureus* (*chp*) sind besonders wichtige Virulenzfaktoren zur Umgehung des Immunsystems. Diese Gene liegen auf einem beta-hämolysierenden Bakteriophagen (McCarthy et al. 2004, Van Wamel et al. 2006, Sung et al. 2008, Verkaik et al. 2008).

Während der Staphylococcal Complement Inhibitor zur Umgehung des Komplementsystems führt und somit die Phagozytose durch die Neutrophilen hemmt, hemmt das Chemotaxis-inhibiting Protein die Aktivierung und Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten (Rooijakkers et al. 2005, Van Wamel et al. 2006). Die Staphylokinase codiert ein Anti-Opsonin und Defensininhibitor und dient wie die beiden anderen Gene des Immun-Evasion-Clusters (IEC: *scn*, *chp*, *sak*) der Umgehung des Immunsystems.

2.4.3 Accessory-Gen-Regulator (*agr*-Gen)

Das Accessory-Gen-Regulator Operon reguliert die Produktion vieler wichtiger Virulenzfaktoren von *S. aureus*, wie die Expression der Exoproteine, Exotoxine und Adhesine. Der Accessory-Gen-Regulator erhöht während der Vermehrung von *S. aureus* die Produktion der sezernierten Virulenzfaktoren, wie der Hämolysine, Proteasen, Lipasen und Nucleasen während er zu diesem Zeitpunkt die Produktion von Oberflächen-assoziierten Virulenzfaktoren herabsetzt (Recsei et al. 1986, Arvidson et al. 2001). Diese Regulation beruht darauf, dass zu Beginn der Infektion Virulenzfaktoren benötigt werden, die der Oberflächenanheftung dienen und in späteren Stadien, mit vermehrter Accessory-Gen-Regulator Produktion, mehr Toxine und Exoenzyme, zur Ernährung und der Umgehung des Immunsystems gebraucht werden (Cheung et al. 1994, Ji et al. 1997, Wright et al. 2005).

Durch DNA-Sequenz-Polymorphismus sind vier verschiedene Accessory-Gen-Regulator Gruppen entstanden, die mit verschiedenen klinischen Erscheinungen und MRSA-assoziierten Gruppen in Verbindung stehen. So gehören CA-MRSA und MRSA mit *tsst-1* (Toxik-Schock-Syndrom-Toxin-1) meisten zur *agr*-Gruppe III (Ji et al. 1997, Dufour et al. 2002, Pearman et al. 2002, Naimi et al. 2003, Vandenesch et al. 2003) intermediär Glycopeptid (Vancomycin) resistente *S. aureus* (GISA) zur *agr*-Gruppe I und II (Sakoulas et al. 2002, Verdier 2004, Moise-Broder et al. 2004). Die Exfoliatin bildenden Stämme, sowie Stämme die zum „Staphylococcal

skaled skin syndrome“ führen, gehören meist zur *agr*-Gruppe IV (Jarraud et al. 2000, Jarraud et al. 2002). Bei LA-MRSA des ST398 wurde bisher nur die *agr*-Gruppe-I nachgewiesen (Köck et al. 2009). Wahrscheinlich beruht dies auf einem möglichen selektiven Vorteil von ST398 mit *agr*-Gruppe I (Sakoulas et al. 2003).

2.4.4 Pyrogenic toxins superantigens (PTSAg)

2.4.4.1 Die Enterotoxine und das Toxin Schock Syndrom Toxin-1 (*tst1*-Gen)

Jedes dieser Superantigene ist in der Lage das Immunsystem zu umgehen und pyrogen zu wirken (Bohach et al. 1990, Marrack et al. 1990, Bohach et al. 1997, Dinges et al. 2000).

Die Staphylokokken Enterotoxine (SEs zu denen die Gene *sea*, *seb*, *sec1-3*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* und *sei* gehören) führen zu Erbrechen, mit oder ohne Diarrhoe, was als „Staphylococcal food poisoning“ (SFP) bezeichnet wird. Die Vergiftung wird durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, mit anschließender Verdauung der SEs, hervorgerufen (Spero et al 1978). Die SEs binden bipolar an die MHCII (Major Histocompatibility Complex II) der antigenpräsentierenden Zellen ohne vorherige Prozessierung sowie an die T-Zellrezeptoren. Dies führt zu einer verstärkten Zytokinproduktion, einer übersteigerten zellulären Immunreaktion und meistens zum Schock (Regelmann et al. 1982, Fleischer et al. 1988).

Die SEs führen außerdem zur Endotoxin Hypersensitivität, da sie die Leberzellen schädigen und somit zu einer verringerten hepatischen Clearance und folglich einer Erhöhung der zirkulierenden Toxinmenge führen (Canonica et al. 1971, Schlievert et al. 1980, Schlievert et al. 1982, Fujikawa et al. 1986).

Das TSST-1 führt zum Toxin-Schock-Syndrom (TSS), durch übermäßige Zytokinproduktion von T-Zellen, welches durch akutes hohes Fieber, Erytheme, Desquamation nach ein bis zwei Wochen (bei Überleben), Hypotension und Beteiligung von mindestens drei Organsystemen gekennzeichnet ist (Spero et al. 1978, Todd et al. 1978, Shands et al. 1980, Reingold et al. 1982, Chesney et al. 1989, Davis et al. 1990, Deresiewicz et al. 1996). Es ist in der Lage die Mucosabarriere zu überwinden (Hamad et al. 1997, Bohach et al. 1998, Melish et al. 1998) und wird vom *tst*-Gen codiert, das auf einem mobilen genetischen Element (MGE) des Staphylokokkenchromosoms sitzt, der sogenannten Pathogenitätsinsel (Blomster-Hautamaa et al. 1986, Lindsay et al. 1998, Novick et al. 1998, Parsonnet et al. 1998).

Die Superantigenität der PTSAgs beruht darauf die Proliferation der T-Lymphozyten zu steigern (Regelmann et al. 1982, Fleischer et al. 1988, Marrack et al. 1990).

Die Gene dieser Toxine werden über MGE wie Plasmide, Bakteriophagen oder Pathogenitätsinseln übertragen (Bohach et al. 1990, Lindsay et al. 1998, Zhang et al. 1998). Die Expression der Gene wird von mindestens drei Regulationssystemen kontrolliert, zu denen der accessory gene regulator, staphylococcal accessory gene regulator und ein Catabolite-Repression-System gehören (Recsej et al. 1986, Cheung et al. 1992).

2.4.4.2 Staphylococcal Superantigen-like Proteine

Die Staphylococcal Superantigen-like Proteine weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit den Superantigenen auf, besitzen jedoch keine Superantigeneigenschaften und liegen meist auf der Pathogenitätsinsel-2 (SaPnI2), die zu den mobilen genetischen Elementen gehört, welche die Virulenzfaktoren übertragen und codieren (Fitzgerald et al. 2003, Itoh et al. 2010). Bisher sind elf *ssl-Gene* bekannt. Die Staphylococcal Superantigen-like Proteine sind an der Umgehung des Immunsystems beteiligt und dienen der besseren Kolonisationsfähigkeit von *S. aureus* (Langley et al. 2005, Bestebroer et al. 2007). So konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Ssl5- bei Endothelschäden die Thrombozytenaggregation erhöht und somit eine bessere Kolonisationsfähigkeit erreicht. Gleichzeitig setzt das Ssl5 die Neutrophileneinwanderung herab und umgeht somit das Immunsystem. Diese Eigenschaft des Ssl5 ist besonders bei der Besiedelung von Gefäßen und Herzklappen von großer Bedeutung (George et al. 2007, Kerrigan et al. 2008). Über das Ssl7 ist bekannt, dass es an IgA bindet und somit die Phagozytose umgeht, da kein Komplementfaktor-5 gebunden werden kann und somit die Aktivierung der Komplementkaskade gehemmt wird (Otten et al. 2004, Langley et al. 2005). Das Ssl10 bindet wiederum an die Fc-Region von IgG und verhindert somit die Komplementaktivierung und die Phagozytose (Idusogie et al. 2000, Deepa et al. 2010, Itoh et al. 2010). Das Ssl3 hemmt den Toll-like Rezeptor-2 und somit die Stimulation von Makrophagen, was die Phagozytose von *S. aureus* herabsetzt (Yokoyama et al. 2012).

2.4.5 MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)

Zu den MSCRAMMs zählen zellwandassoziierte Proteine, die der Oberflächenanheftung von *S. aureus* dienen. Dazu gehören der Clumping Faktor A und B, die Kollagen- und Fibrinogen-bindende Proteine, das Fibronectinbindende-Protein, das Staphylokokken Oberflächenprotein G, sowie das Protein A (Foster et al 1998, Gordon et al. 2008). *S.-aureus* verfügt über zahlreiche

dieser Proteine, die sezerniert werden, um dann kovalent an der Zelloberfläche anhaften zu können (Clarke et al. 2006).

2.4.5.1 Protein A

Das Protein A ist zellwandassoziiert und besteht aus einer Region-X und einer Fc-Bindungsregion, die der Bindung an das Fc-Fragment der Immunglobuline dient (Forsgren et al. 1966, Sjöquist et al. 1967, Sjöquist et al. 1968, Schneewind et al. 1992, Frénay et al. 1996). Durch seine Bindung an das Fc-Fragment von Antikörpern der Klasse IgG blockiert es die Bindung des Antikörpers mit dem Fc-Fragment an neutrophile Granulozyten, was seine Opsonierung und Phagozytose verhindert (Gatermann 2009, Foster et al. 2002).

Die polymorphe Region-X des Protein-A Genes (*spa*) kann zur Sequenzierung von MRSA herangezogen werden, um sie einem *spa*-Typen zuordnen zu können (Frénay et al. 1996).

Das Protein A führt bei Hamstern, Meerschweinchen und Kaninchen zu Immunreaktionen, die zur Gewebszerstörung führen (Gustafson et al. 1967, Sjöquist et al. 1967, Gustafson et al. 1968). Außerdem kann die Fc-Bindungsregion des Protein A zu Gerinnungsstörungen durch Bindung an den VWF (Van-Willebrand-Faktor) und zur Aktivierung der Tumor-Nekrose-Faktor-1 Kaskade (TNF-1 Kaskade) v.a. in der Lunge führen. Die Aktivierung führt zu Entzündungen bis hin zum Schock bei großen TNF Konzentrationen. Dies erklärt die Virulenz von Protein A in Verbindung mit Pneumonien (Hartleib et al. 2000, Gomez et al. 2004).

2.4.5.2 Clumping Faktor A und B (*clfA*-/ *clfB*-Gen)

Der Clumping Faktor aktiviert die Gerinnungskaskade, führt zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und dient somit der Oberflächenanheftung und -besiedelung (Carter et al. 2004).

Virulenzfaktoren	Lokalisation	Angriffsort	Wirkmechanismus
Protein A	Zellwandassoziiertes Protein	Fc-Stück von IgG	Hemmung phagozytierender Zellen, Opsonierung wird behindert
Fibronectinbindendes Protein	Zellwandassoziiertes Protein	Multiadhäsionsproteine in der extrazellulären Matrix	Ermöglicht die Anheftung und Kolonisation von Geweben, Thromben und Koagula
Collagen-binding Adhesin	Zellwandassoziiertes Protein	Bindung an Kollagen	Kolonisation, wichtig in frühen Stadien der Infektion
Fibrinogenbindungs Protein	Zellwandassoziiertes Protein	Bindung an Fibrinogen	Anheftung, Kolonisation, gute Anheftung an Wundoberflächen
Kollagenbindendes Protein	Zellwandassoziiertes Protein	Direkte Bindung an eines der Hauptstrukturproteine	Häufigste Ursache bakterieller Arthritis / Osteomyelitis
Clumping Faktor A + B	Zellwandassoziiertes Protein	Bindung und Aktivierung von Fibrinogen	Aktivierung von Thrombozyten; Aktivierung der Gerinnungskaskade
Koagulase	Oberflächenassoziiertes Exotoxin	Bindet an Prothrombin, bildet Staphylothrombin-Komplexe	Fibrinogenaktivierung, unterstützt die Oberflächenanheftung
Elastin-bindendes Protein	Oberflächennahes Exotoxin	Bindet an Bestandteile der Extrazellulärmatrix von elastischem Gewebe	Beteiligt an der Gewebsanheftung
Alpha-Hämolysin	Sekretorisches Protein	Porenbildung an der Membran von Körperzellen, Aktivierung von Zytokinen, führt zur Koagulation	Endothelzellschädigung, dermatonekrotische Wirkung, intravasale Koagulation
Beta-Hämolysin	Sekretorisches Protein	Sphingomyelinase, zerstört Erythrozyten, Monozyten	Hämolyse, hämorrhagische Organveränderungen, sclerale Ödeme

Delta-Hämolysin	Sekretorisches Protein	Zellmembran	Zerstört Erythrozyten, Zellen und Organellen
Das PVL, die Leukozydine und das Gamma-Hämolysin	Sekretorische Proteine (aus 2 Komponenten bestehend)	PVL und andere Leukozydine: Stimulieren und zerstören Polymorph-kernige Leukozyten, zytotoxisch Gamma-Hämolysin: Leukotoxisch und erythrotisch	Dermatonekrose, Abszesse, Furunkel PVL: nekrotisierende Pneumonien Exfoliative Dermatitis
Exfoliative Toxine	Sekretorische Proteine	Binden an keratohyaline Granula im Stratum granulosum	
TSST- 1 und Enterotoxine	Sekretorische Proteine	Superantigene Wirkung, Binden an MHC II mit starker T-Zell-Aktivierung	Immunsuppression, Fieber, endotoxischer Schock, Ermesis, Lebensmittelvergiftung
DNAse	Sekretorisches Protein	Nukleinsäuren	Zerstörung des Erbguts
Potassium-translocating ATPase A und B	Oberflächengebundene	“Bakterienoberfläche”	Kaliumtransfer, Energiegewinnung
Kapsel	Oberflächengebundene Schleimkapsel	Abwehrzellen, Gefäße	Schutz der Zelle vor Abwehr, Beteiligung an Biofilmen
Katalase	Sekretorisches Protein	Sauerstoffradikale	Hemmung der Wirkung von Sauerstoffradikalen
Staphylococcal-Superantigen like proteins	Sekretorische Proteine	IgA, IgG, Thrombozyten, Komplementfaktor-5, Toll-Like-Rezeptor, u.a.	Umgehung des Immunsystems
Staphylokinase, Chemotaxis-inhibiting protein und Staphylococcal complement inhibitor	Sekretorische Proteine, extracellulär	Staphylokinase aktiviert eine Serin-Protease, Fibrinolyse, steigern alle das invasive Potential	Umgehung des Immunsystems

St.-aureus Oberflächenprotein G	Oberflächenprotein	Nasenepitelzellen	Kolonisation, Adhäsion an Nasenepitelzellen und Biofilmbildung

Tabelle 4: Wichtige Virulenzfaktoren (modifiziert nach Foster 2002).

2.5 MRSA bei Menschen und Tieren

2.5.1 Hospital-acquired Methicillin-resistente *S. aureus* (HA-MRSA)

MRSA-Vorkommen beim Menschen sind seit den 60ern bekannt und mittlerweile sind MRSA weltweit verbreitet (Monecke et al. 2008a). Die ursprünglichen MRSA-Stämme des Types *SCCmec* Typ I-III waren vor vielen Jahren noch HA-MRSA-Infektionen zuzuordnen (Ito et al. 2001). Diese original MRSA wurden durch MLST typisiert und gehören ursprünglich zu den CC5 (Clonal Complex), CC8, CC22, CC30 und CC45 (Olivera et al. 2001a, Enright et al. 2002). Sie besitzen eine hohe Oxacillin-Resistenz (Ender et al. 2004), verbunden mit einem erhöhten Glucose-Verbrauch, einer geringeren Wachstumsrate sowie einer geringeren Zellausbeute (Lee et al. 2007). Dieser MRSA-Typ hatte nur in Krankenhäusern einen Selektionsvorteil, da er dort einer hohen Antibiotikaexposition ausgesetzt war. Außerhalb von Krankenhäusern konnte er jedoch nicht mit den schnell wachsenden Wildtypen mithalten. Diese gehörten den neuen *SCCmec* Typen IV und V an (Daum et al. 2002, Ito et al. 2004, Monecke et al. 2008a) und litten nicht unter einer verringerten Replikationsrate im Gegensatz zu den HA-MRSA (Lee et al. 2007).

Stämme mit diesen neuen Eigenschaften konnten sich schnell in Krankenhäuser hinein aber v.a. auch in der Bevölkerung verbreiten (O'Brien et al. 2004).

Insgesamt werden bei HA-MRSA v.a. die *SCCmec*-Typen I, II und III nachgewiesen (Ito et al. 2001, Enright et al. 2002). Der Typ II und III enthält neben dem *mecA*-Gen, noch weitere Resistenzgene, was multiple Antibiotikaresistenzen zur Folge hat (Ito et al. 2001, Morgan et al. 2008).

Langzeittherapiepatienten, Immunsupprimierte und v.a. ältere Menschen infizieren sich oft bei einer stationären Behandlung oder auf Intensivstationen von Krankenhäusern mit HA-MRSA, die z.B. zu eitrigen Infektionen, Pneumonien, Sepsis und Endokarditis führen (Coello et al. 1997, Haddadin et al. 2002, Friedrich et al. 2009, Gattermann 2009). Bei MRSA-Septikämien liegt die Mortalitätsrate bei über 35 % (Wyllie et al. 2006, Guilarde et al. 2006, Shureland et al. 2007). Auch eine Antibiotikatherapie, die zu einer verringerten Schleimhautflora führt, fördert die Besiedelung mit MRSA (Daschner et al. 2002). Ein weiteres Hauptrisiko sich mit HA-MRSA zu infizieren ist der Kontakt mit infizierten Patienten oder infiziertem Krankenhauspersonal. Die Übertragung erfolgt meist aufgrund einer Besiedelung der Haut des Personals, v.a. die Hände des Personals sind oft infiziert (Haddadin et al. 2002).

Die Datenanalysen des deutschen Krankenhausinfektions-Surveillance-Systems (KISS) zeigen einen deutlichen Anstieg der MRSA-Fälle in deutschen Krankenhäusern, mit einem Anstieg der

Gesamtinzidenz von 0,83 im Jahre 2006 auf 0,89 im Jahre 2011. Auch die mittlere tägliche MRSA-Last stieg von 2006 bis 2011 von 1,35 auf 1,79 als gepoolter arithmetischer Mittelwert (Modul MRSA-KISS, Referenzdaten/<http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/mrsa/MRSAReferenz2011.pdf>).

2.5.2 Community-associated MRSA (CA-MRSA)

CA-MRSA sind mittlerweile ein großes Problem in nahezu allen Industrieländern (De Leo et al. 2010). Im Gegensatz zu HA-MRSA, für die es prädisponierende Faktoren gibt, befallen CA-MRSA auch gesunde Menschen (Herold et al. 1998), da diese Stämme ein vermutlich höheres Virulenzpotential haben (De Leo et al. 2010). Zusätzlich besitzen einige CA-MRSA, wie der Stamm USA300, die Fähigkeit sich schnell auszubreiten (De Leo et al. 2010). Diese Charakteristiken sind wahrscheinlich der Grund, warum sich die CA-MRSA in so vielen Länder ausgebreitet haben (Vandenesch et al. 2003, Tristan et al. 2006).

Als klinische Bilder einer CA-MRSA Infektion überwiegen Haut- und Weichteilinfektionen wie Furunkel und nekrotisierende Fasciitis aber auch nekrotisierende Pneumonien (Gillet et al. 2002, Linde et Lehn 2008). So konnte in Frankreich gezeigt werden, dass CA-MRSA Verursacher von 1-3 % aller Haut- und Weichteilinfektionen sind (Robert et al. 2005, Del Giudice et al. 2006). Besonders oft sind Kinder und Jugendliche, ohne prädisponierende Risiken, betroffen (Paintsil et al. 2007, O'Brien et al. 1999). Jedoch werden das Infektionsrisiko und die Verbreitung von CA-MRSA durch Personen mit einer schlechten Körperhygiene verstärkt. Dasselbe trifft auf Personengruppen zu, die sportlichen Aktivitäten mit viel Körperkontakt nachgehen, wie Footballspielern, sowie auf homosexuelle Männer, Gefängnisinsassen, Soldaten und Immunsupprimierte (Debresinski et al. 2005, Kazakova et al. 2005, Köck et al. 2009, Popovich et al. 2012).

Die ersten CA-MRSA Fälle, von Personen, die keinen Kontakt zu Gesundheitseinrichtungen hatten und in gering besiedelten Gebieten lebten, wurden in den frühen 90er Jahren in Kimberley, West-Australien, beschrieben (Udo et al. 1993). Diese MRSA-Stämme, die später als WA-MRSA-1 oder WA-1 benannt wurden, waren nicht multiresistent (Udo et al. 1993, Coombs et al. 2006). Auch in den USA wurden von 1997-1999 Fälle beschrieben, bei denen gesunde Kinder an CA-MRSA mit Sepsis oder nekrotisierender Pneumonie verstarben. Dieser CA-MRSA Stamm ist unter dem Namen MW-2, mit *SCCmec* IV bekannt und ein naher Verwandter des Stammes WA-1 (Coombs et al. 2006, Baba et al. 2002).

Im Vergleich zu den meisten HA-MRSA sind viele CA-MRSA sensibel gegenüber nicht β -Laktam-Antibiotika und somit nicht multiresistent (Herold et al 1998, Daum et al. 2002). Diese früheren Ausbrüche sind der Anfang der jetzigen CA-MRSA Epidemie (De Leo et al. 2010)

Die Methicillin-Resistenz des kompakteren und kleineren Types *SCCmec* IV könnte besonders gut an MSSA weitergegeben werden. Dies würde den Selektionsvorteil der schnelleren Verbreitung, der CA-MRSA mit *SCCmec* IV, in der Bevölkerung erklären (Ma et al. 2002, Vandenesch et al. 2003). Ursprünglich gehörten die CA-MRSA den CC8 und CC30 an (Carleton et al. 2004, Robinson et al. 2005).

Der *SCCmec* Typ IV, sowie das PVL-Gen lassen sich mit CA-MRSA weltweit assoziieren, wobei das PVL nur von ca. 5 % der CA-MRSA gebildet wird (Vandenesch et al. 2003).

CA-MRSA treten v.a. als *SCCmec* Typ IV und V auf, da v.a. *SCCmec* IV sehr viel kleiner und mobiler ist, als die HA-MRSA Typen I-III, was ihr schnelleres Wachstum und ihre schnellere Ausbreitung, im Gegensatz zu den größeren HA-MRSA, fördert (Baba et al. 2002, Daum et al. 2002). In Europa verbreitet sich v.a. der CA-MRSA Stamm ST80, der PVL-positiv ist und dem Typ *SCCmec* IV angehört und in den USA der Stamm USA300 (De Leo et al. 2010).

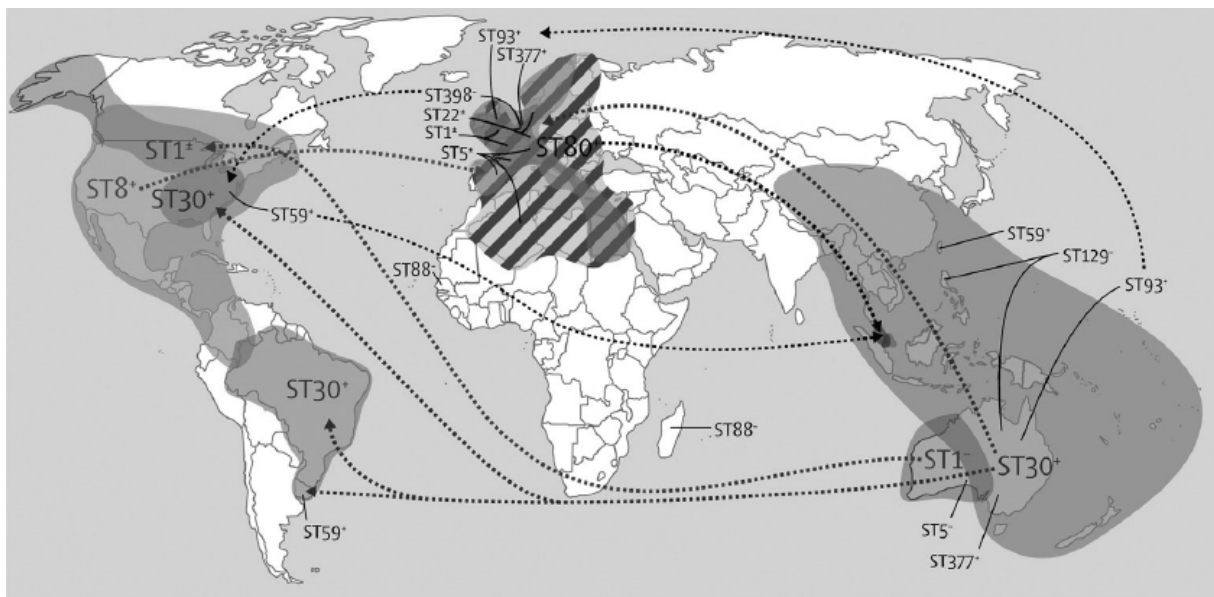


Abbildung 5: CA-MRSA Verbreitung und ST (modifiziert nach De Leo et al. 2010).

2.5.3 Livestock associated MRSA (LA-MRSA)

2.5.3.1 Vorkommen und Evolution von LA-MRSA bei Schweinen, Personen mit Schweinekontakt

Über das Vorkommen von MRSA bei Schweinen wurde zum ersten Mal in Frankreich und den Niederlanden berichtet und der ST398 isoliert (Armand-Lefèvre et al. 2005). In Frankreich wurde ein weitaus höheres Besiedelungsrisiko von Schweinebauern mit MRSA mit 44,6 %, im Vergleich zur Normalbevölkerung mit 24,1 % festgestellt (Aubry-Damon et al. 2004). Danach wurde auch in den Niederlanden eine hohe Besiedlungsrate von Schweinen mit MRSA des ST398 festgestellt und auch in anderen Ländern Europas, sowie Asien und Nordamerika wurde dieser ST nachgewiesen (Voss et al. 2005, Cuny et al. 2010, Graveland et al. 2011, Smith et al. 2011). Im Schlachthof von Teneriffa wiesen die Schweine eine Kolonisationsrate mit MRSA von 85,7 % auf (Arias 2012). In China wurde der ST9 in Staubproben aus Schweinebetrieben nachgewiesen (Wagenaar et al. 2009) und auch andere ST, die häufig beim Menschen vorkommen, wie der ST5/ USA100 wurde in Kanada (Khanna et al. 2008) und ST22 in Irland bei Schweinen nachgewiesen (Horgan et al. 2011). In Italien waren Schweine im Schlachthof mit dem ST9, ST1/t127 und ST97 besiedelt (Battisti et al. 2010). Der ST1 und ST49 kommt häufig in italienischen Krankenhäusern vor und wurde auch bei Schweinen in der Schweiz nachgewiesen (Monaco et al. 2010, Overesch 2011).

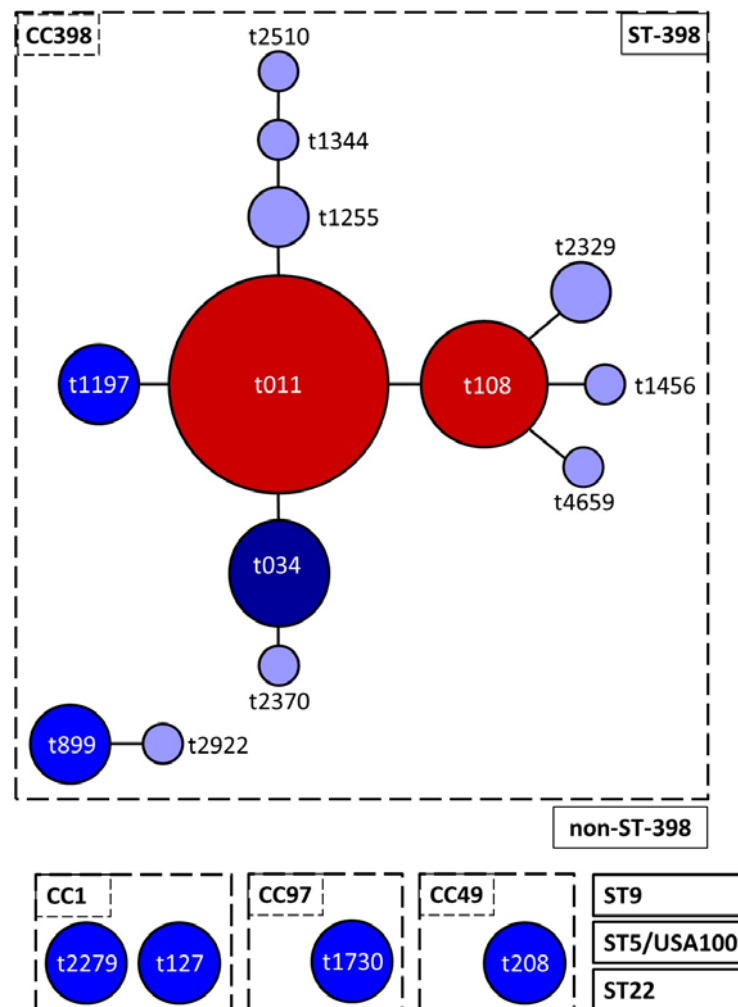


Abbildung 6: ST398 und andere weltweit bei Schweinen isolierte ST (modifiziert nach Pantosti et al. 2012).

Auch MSSA des CC398 kommen häufig in Schweinebeständen vor, allerdings sind genauere Erkenntnisse über deren Evolution sowie weltweiten Verbreitung noch nicht geklärt (Ven Belkum et al. 2008, Hasman et al. 2010).

Der ST398 scheint schweineassoziiert zu sein jedoch kann er auch andere Wirte befallen (Rasigade et al. 2010, Schijffelen et al. 2010) und wird von Schweinen auf Landwirte sowie seltener von diesen auf weitere Familienmitglieder übertragen. In Belgien wurden bei 37,8 % der Schweinebauern MRSA des ST398 nachgewiesen und in Deutschland bei 86 % der Landwirte und 45% der Schweinetierärzte (Cuny et al. 2009, Denis et al. 2009). Die Übertragung von Landwirten auf andere Menschen geschieht selten und deren Dekolonisation erfolgt relativ schnell, solange kein weiterer Kontakt zu Schweinen besteht (Graveland et al. 2011, Van Cleef et al. 2011). So konnte Köck et al. nachweisen, dass 94 % der Menschen, die wenig Kontakt zu

Schweinen haben und nach dem Besuch eines Schweinebetriebes positiv waren nach 24h keine MRSA des ST398 in der Nase aufweisen (Köck et al. 2012). Allerdings konnte er auch nachweisen dass Landwirte eher persistent besiedelt sind und 59 % der Landwirte auch noch nach längerem Urlaub ohne Schweine besiedelt bleiben. Sanierte Landwirte infizieren sich bis auf 10 % innerhalb der ersten drei Tage wieder mit MRSA im Schweinebetrieb (Köck et al. 2012). Somit besteht ein hohes Risiko sich bei der Routinearbeit im Schweinestall mit MRSA zu besiedeln, da bei einer Studie mit Staubmasken 68 % der Masken nach dem Tragen im Schweinebetrieb mit MRSA besiedelt waren. Dies zeigt, dass MRSA auch über den Staub im Betrieb übertragen werden (Nathaus et al. 2011). Auch auf Tierärzte wird der ST398 häufig während der Arbeit übertragen, wie Wulf et al. nachweisen konnten, da 12,5 % der Schweinetierärzte, einer Schweinegesundheitskonferenz in Dänemark, besiedelt waren (Wulf et al. 2008).

Allerdings wird der ST398 auch bei Menschen ohne Tierkontakt nachgewiesen, sodass ein ST398 Reservoir außerhalb von Schweinebetrieben bestehen muss (Van der Mee-Marquet et al. 2011). So wurde über einen Ausbruch von MRSA des ST398 in einem dänischen Krankenhaus 2007 berichtet. Dies zeigt, dass der Klon auch von Mensch zu Mensch überspringen kann (Wulf et al. 2008). So zeigen immer mehr Studien, dass ST398 Stämme immer häufiger schwerwiegende Erkrankungen bei Landwirten und Angehörigen hervorrufen (Rasigade et al. 2010, Schijffelen et al. 2010). In Spanien wurde der ST398 aus einem purulenten Thoraxexsudat eines daran versterbenden Schweinebauern isoliert und auch ein Sohn und 50 % seiner Schweine waren mit MRSA nasal besiedelt (Lozano et al. 2011).

In manchen niederländischen Regionen sind bis zu 25 % der MRSA-Fälle in Krankenhäusern auf Infektionen mit dem CC398 zurückzuführen (Van Cleef et al. 2011). Bisher wurden noch keine PVL-positiven CC398 Isolate bei Schweinen und Menschen mit Schweinekontakt nachgewiesen, allerdings traten schon PVL-positive Isolate des CC398 in Krankenhäusern in China und den Niederlanden sowie Schweden auf (Yu et al. 2008, Welinder-Olsen et al. 2008, Van Belkum et al. 2008, Stegger et al. 2010).

Die meisten ST398 Isolate gehören den *spa*-Typen t011, t034 oder nahe verwandten *spa*-Typen an und sind meistens Träger der *SCC_{mec} V* (Smith et al. 2008, Wulf et al. 2008, Bhat et al. 2009, Potel et al. 2012). So konnten Schmidt et al. in einer österreichischen Krankenhausstudie den Zusammenhang der Kolonisation eines Patienten und seiner Schweine mit MRSA des *spa*-Types t011 nachweisen. Ebenso kam es innerhalb der Gesundheitseinrichtungen zur Übertragung dieses *spa*-Types auf Mitpatienten sowie auf eine Krankenschwester (Schmid et al. 2011).

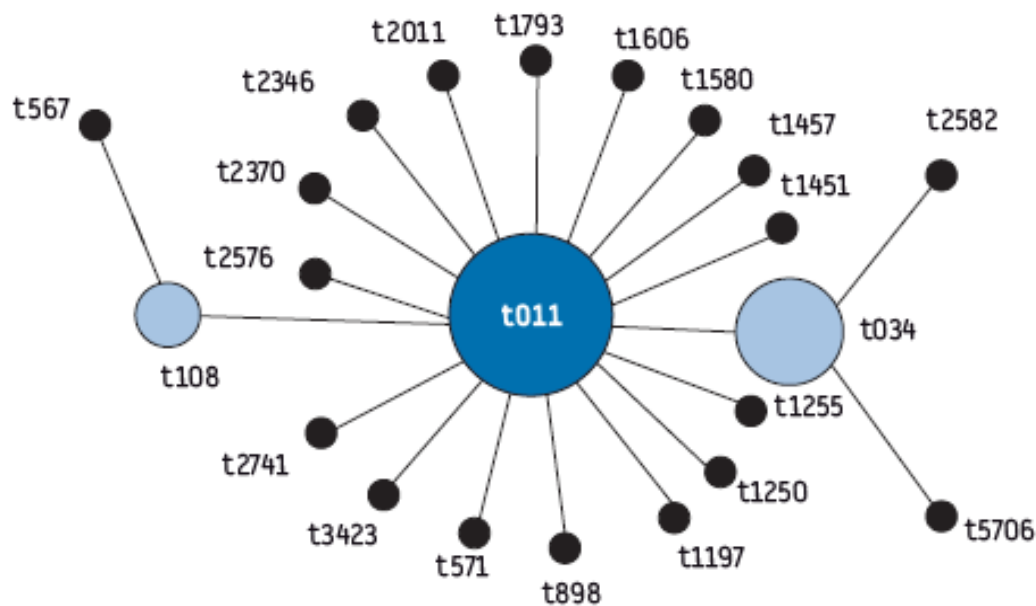


Abbildung 7: *Spa*-Typ t011 und verwandte Subtypen (nach Reischl et al. 2009).

Da eine β -converting Prophage bei einigen ST398 nachgewiesen wurde, die dem Entkommen der MRSA vor dem menschlichen Immunsystems dient, müssen einige ST398 Stämme mehr an den Menschen adaptiert sein (McCarthy et al. 2011). Der ST398 muss auch angesichts seiner vielen verschiedenen *spa*-Typen über eine große genetische Diversität verfügen (Argudin et al. 2010). Price et al. untersuchten 88 MRSA des CC398 und fanden bei 61 % den *SCCmec*-Typ Vc (5C 2&5), welcher das Kadmium-Zink Resistenzgen *czrC* enthält. Außerdem wurde das *czrC*-Gen auch bei zwei CC398 LA-MSSA Stämmen nachgewiesen. Das Resistenzgen wurde von LA-MRSA des ST398 erworben bzw. MRSA mit dem *crzC*-Gen konnten sich besser verbreiten, da Zink und andere Metalle in Schweinefuttermitteln enthalten sind (Cavaco et al. 2011). Moodly et al. konnten nachweisen, dass der Zusatz von Tetracyclin oder Zink im Schweinefutter die Anzahl der MRSA des ST398 in der Schweinenase erhöht ohne einen Effekt auf die Übertragung zu haben (Moodly et al. 2010).

Der ST398 soll zunächst beim Menschen aufgetreten sein und sich in der Population gut verbreitet haben. Vom Menschen aus wurde er dann versehentlich auf Schweine übertragen. Danach hat er aufgrund des Selektionsdruckes durch Antibiotikagaben verschiedene Resistenz-, Virulenzgene sowie *SCCmec*-Kassetten erworben, sodass die Entwicklung und Ausbreitung von

ST398 Stämmen in Schweinebeständen weiter gefördert wurde. Der ursprüngliche CC398 Klon könnte auch ein CC398-MSSA gewesen sein und in Schweinebetrieben die Methicillin- sowie Tetracyclin-Resistenzgene erworben haben (Price et al. 2012). Die meisten ST398 Stämme sind gegen Tetracycline, Macrolide, Lincosamide und Glycopeptide resistent, sowie einige Stämme auch noch gegen Trimethoprim, Pleuromutiline und Apramycin (Kadec et al. 2009, Fessler et al. 2010, Hausschild et al. 2012). Da der Tetracyclinverbrauch in der Tiermast hoch ist, stellt er einen Selektionsfaktor für MRSA des ST398 dar.

Des Weiteren hat die hohe Übertragungsrate des ST398 zwischen Schweinen dazu beigetragen, dass eine schnelle Wirtsadaptation stattgefunden hat und der entstandene Stamm schlechter an Menschen angepasst war, was seine unregelmäßige Übertragung von „Livestock“ zu Menschen und weiter von Mensch zu Mensch erklärt (Baquero et al. 2012).

Das Resultat dieser Adaptation besteht in der Entstehung von zwei ST398 Subpopulationen, einer menschen- und einer schweineassoziierten (Wright et al. 1982, Baquero et al. 2012).

Die Tatsache, dass den LA-MRSA assoziierten ST398, das Restriktionsmodifikationsenzym I fehlt könnte der Grund dafür sein, dass der ST398 in der Lage ist weitere Gene schnell zu erwerben (Schijffelen et al. 2010). Außerdem tragen die wenigen Stämme die von Landwirten weiter übertragen werden dazu bei, dass MRSA des CC398 sich wieder besser an den Menschen anpassen, jedoch ihre in der Schweinepopulation erworbenen Virulenz- und Resistenzgene nicht verlieren (Freitas et al. 2011, Baquero et al. 2012).

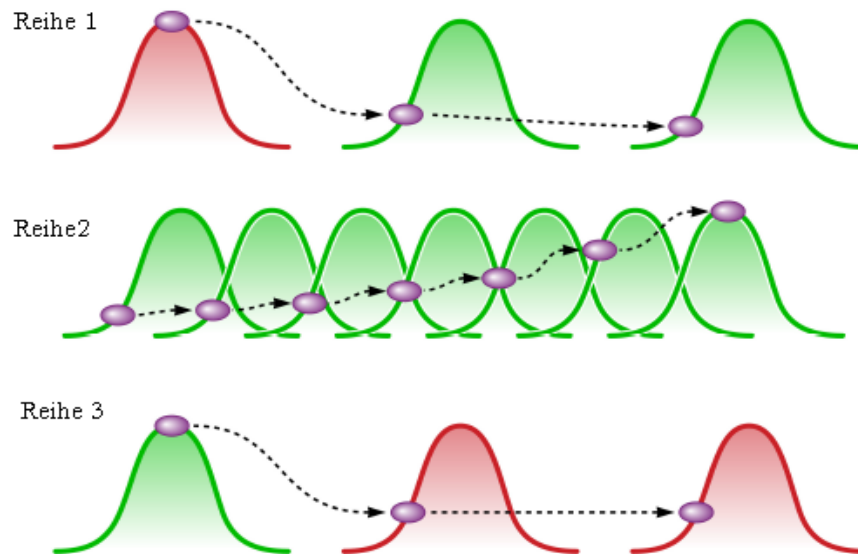


Abbildung 8: Anpassung der MRSA (modifiziert nach Baquero et al. 2012).

In rot werden die menschenassoziierten und in grün die LA-assoziierten Berge, die die Fitness („Angepasstheit“) der MRSA widerspiegeln sollen, dargestellt.

Reihe 1 stellt die frühere Übertragung des CC398 von Mensch auf Schwein dar. Die Fitness der CC398 ST ist gering falls keine hohe Übertragungsrate zwischen den Schweinen erfolgt.

Reihe 2 zeigt eine schnelle Übertragung und schnelle Anpassung an den neuen Wirt bis zum Erreichen optimaler Fitnessbedingungen. Der CC398 ist jetzt an Schweine angepasst

Reihe 3 stellt die erneute Übertragung auf den Menschen dar. Sowohl die Fitness des CC398 als auch die Übertragungsrate zwischen Menschen ist noch gering kann aber unter günstigen Bedingungen wie einer Population mit Immunsuppression, z.B. in Krankenhäusern jederzeit ansteigen und sich verbreiten.

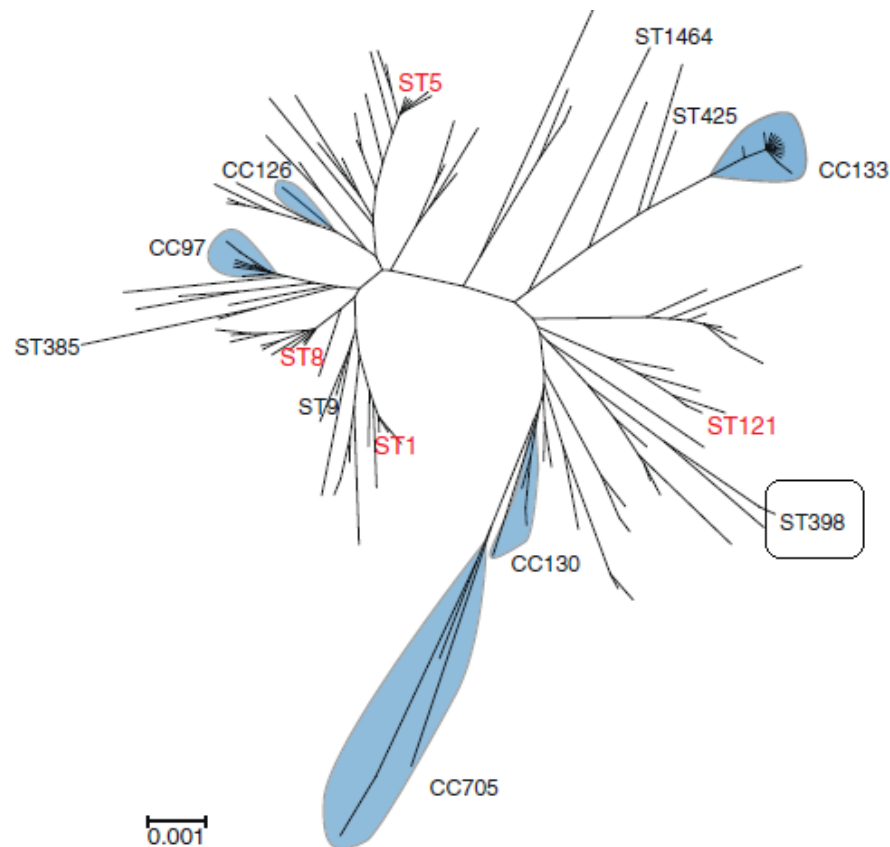


Abbildung 9: Verwandtschaft verschiedener LA-MRSA Stämme (nach Fitzgerald et al. 2012).

Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden mit MLST analysiert. Tier-assoziierte Stämme, die auch beim Menschen nachgewiesen wurden, sind in rot markiert, häufig bei Wiederkäuern auftretende Stämme sind in blau markiert sowie der in Schweinehaltungen dominierende Stamm ST398 wurde aufgeführt.

Das Genom von MRSA besteht aus dem sogenannten „Core-Genom“, dem „Core-Variablen-Genom“ (CV) und mobiler genetischer Elemente (MGEs). Während das „Core-Genom“ bei *S. aureus*-Isolaten hoch konserviert ist codiert das CV-Genom Oberflächenproteine, sezernierte Proteine und deren Regulatoren, deren Vorkommen variiert. Dabei besitzt jeder CC eine festgelegte einzigartige Kombination an CV-Genen (McCarthy et al. 2010). Die MGEs können durch horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien übertragen werden. Dazu gehören Bakteriophagen, Plasmide, Pathogenitätsinseln (SaPIs), SCCs, Transposons sowie Insertionssequenzen (Iss) (Lindsay et al. 2006). Diese MGEs übertragen klinisch wichtige Virulenzgene, Antibiotika-, und Schwermetallresistenzgene und die Übertragung variiert schon innerhalb eines ST sowie zwischen verschiedenen ST (McCarthy et al. 2012). Das MRSA Genom

kann sich durch Punktmutation verändern durch äußere Einflüsse. So codieren MGEs meistens Gene, die aufgrund von Selektionsdruck erworben wurden (Lindsay et al. 2010).

Da der ST398 keine einzigartigen Oberflächenproteine besitzt, die seine Anpassung an Schweine erklären könnte, sondern bestimmte Varianten die denen menschlichen MRSA ST ähnlich sind lässt darauf schließen, dass weder das „Core-Genom“ noch das CV-Genom für die Spezialisierung verantwortlich sind (Corvaglia et al. 2010, Guinane et al. 2010, Schijffelen et al. 2010, Herron-Olsen et al. 2011, Garcia-Alvarez et al. 2011). Jedoch sind verschiedene MGEs oft bei tierassoziierten oder menschenassoziierten ST nachgewiesen worden, die die Wirtsspezifität erklären könnten (Van Wamel et al. 2006).

S. aureus benötigt Eisen, aus dem Hämoglobin, zum Überleben. Das Hämoglobin wird von *S. aureus* mit Hilfe von Hämolytinen gewonnen und an den Staphylokokken Rezeptor „Iron surface determinant B“ (*IsdB*) gebunden. Jedoch unterscheidet sich die Aminosäuresequenz von Hämoglobin verschiedener Tierarten, sodass die Bindungsfähigkeit von *IsdB* an Hämoglobin verschiedener Tierarten sowie dessen Mutation ein Grund für die Wirtsspezifität einiger ST sein könnte (Pishchany et al. 2010).

2.5.3.2 Rinder

S. aureus ist bei Milchkühen als Erreger von Mastitiden bekannt (Waage et al. 1998, Tenhagen et al. 2006, Piepers et al. 2007). Erstmals wurden MRSA bei einer Milchkuh mit Mastitis im Jahre 1972 nachgewiesen (Devriese et al. 1972).

Der ST-398 konnte in Belgien bei Milchkühen mit Mastitis nachgewiesen werden. In 118 Milchkuhbeständen mit Mastitisproblemen wurde bei 9,3 % der Milchproben MRSA nachgewiesen, sodass fast 10 % der Betriebe mit Mastitisproblemen durch *S. aureus* auch unter MRSA leiden. Alle Isolate gehörten zum ST398 mit *SCCmec* IV und V, mit *spa* t011 und t567 (Vanderhaegen et al. 2010).

Bei ungarischen MRSA-Isolaten von Rindern mit subklinischer Mastitis wurde der *spa* Typ t127, mit ST-1 und *SCCmec* IV, der PVL-negativ war, isoliert. Da auch bei einem Mitarbeiter das gleiche Isolat nachgewiesen wurde kann man auf eine direkte Übertragung zwischen Rindern und Menschen schließen (Juhász-Kaszanyitzky et al. 2007).

In Kälbermastbeständen in den Niederlanden konnte bei 88 % der Betriebe MRSA nachgewiesen werden. Ein gleichzeitiges Screening der dazugehörigen Landwirte und deren Familien ergab eine MRSA-Prävalenz von 33 % bei den Landwirten und bei 8 % der Familienmitglieder. Sowohl bei den humanen als auch den Isolaten der Rinder konnte ST398 nachgewiesen werden (Graveland

et al. 2010). Die unterschiedliche Prävalenz bei den Landwirten und ihren Familienmitgliedern kann auf eine unregelmäßige Mensch zu Mensch Übertragung von ST398 hindeuten (VanRijen et al. 2008, Wassenberg et al. 2008, Graveland et al. 2010). Der *spa* Typ t011, mit *SCCmec* V wurde auch in deutschen Rinderbeständen und bei den dazugehörigen Landwirten isoliert (Spohr et al. 2011).

Monecke et al. (2008b) untersuchten 128 *S. aureus* Isolate von Kühen mittels Microarray (Cloning chip technologies, Jena, Germany). Darunter wurden zwei MRSA-Isolate identifiziert. Ein Stamm gehörte zum CC8 und der andere Stamm zum ST398, mit *spa* typ 34 dessen Vorkommen bereits auch bei anderen Tieren und bei Menschen beschrieben wurde (Monecke et al. 2007).

2.5.3.3 Pferde

MRSA wurden 1996 zum ersten Mal bei Pferden beschrieben. Die MRSA-Kolonisationsrate schwankt in den verschiedenen Ländern Europas. So fand in Portugal eine Studie statt, bei der 71 Pferde mittels Nasentupfer beprobt wurden. Von den Isolaten waren zwei Oxacillin-resistent und Träger des *mecA*-Gens. Als Stämme lagen ST5 (FMVA3/10), mit *SCCmec* IV und ST398 (FMVA16/10), mit *SCCmec* Typ vor. Der ST5 (FMVA3/10) ist ein humaner Klon, der zuvor noch nicht bei Pferden in Europa nachgewiesen wurde. Dies zeigt wiederum, dass eine Übertragung von MRSA zwischen Pferden und Menschen stattfinden kann (Couto et al. 2011). Auch in Schweden wurde bei Pferden die ST-398, mit t-011 und ST-8 mit t-064 nachgewiesen. Alle Isolate waren Träger des *mecA*- und des *nuc*-Gens (Bergström et al. 2012).

Auch der Stamm ST8 (CMRSA5/USA500) führt zu Kolonisation und Infektion von Pferden v.a. in Kanada. Bei ST8 handelt es sich vermutlich um einen humanen Klone, der sich an Pferde adaptiert hat (Weese et al. 2010). ST8 wurde bereits bei Wundinfektionen, Infektionen von Venenverwilkathetern, Bakteriämie, Pneumonien, Implantatinfektionen, septischer Arthritis, Omphalophlebitis, Glutealabszess und Osteomyelitis von Pferden nachgewiesen (Weese et al. 2005).

In den Niederlanden dominieren bei Pferden die Stämme ST8, mit *spa*-typ t064 und ST398 mit *spa*-type t011 (an Duijkeren et al. 2010). So wurde die Übertragung von einem Friesenfohlen auf ein 16-jähriges Mädchen mit einer Wunde am Fuß nachgewiesen. Sowohl das MRSA-Isolat des Mädchens, als auch das des Nasentupfer des Fohlens waren Träger des *mecA*-Gens und gehörten zum Stamm ST398 mit *spa* Typ t011 (an Duijkeren et al. 2011). Auch eine Wundinfektion eines Pferdetierarztes durch ein Pferd konnte nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um eine

Wundinfektion mit dem Stamm CMRSA-5, also ST-8 mit *SCCmec*-Typ IV und *spa*007 (Weese et al. 2005), der auch bei drei Tierarzthelferinnen mit Kontakt zu Fohlen zu Hautinfektionen geführt hat (Weese et al. 2006).

An der veterinärmedizinischen Universität in Wien wurde bei fünf Pferden der MRSA ST-254 nachgewiesen, mit *SCCmec* Typ IVd (Cuny et al. 2006). Dieser Stamm wurde schon oft in den 90er Jahren bei HA-MRSA isoliert (Witte et al. 1997). Jedoch besitzen der humane Stamm aus den 90er Jahren und der equine ST-254 unterschiedliche *SCCmec* IV Subtypen, was einen Austausch zwischen Pferd und Mensch jedoch nicht ausschließt. Der Unterschied könnte jedoch auch darauf beruhen, dass ein MSSA ST-254 auf Pferde übertragen wurde und später die zum humanen ST-254 unterschiedliche *SCCmec* IV erwarb (Skov et al. 2005).

2.5.3.4 Esel

MRSA konnten in der Konjunktivalflora gesunder Esel auf Sizilien (Italien) nachgewiesen werden (Foti et al. 2012). Von den untersuchten Isolaten handelte es sich bei 26,9 % um Staphylokokken, von denen 26,9 % der Stämme Oxacillin und Methicillin resistent waren. Das *mecA*-Gen wurde bei zwei *S. aureus* Stämmen nachgewiesen (Foti et al. 2012). Esel können somit als Träger von MRSA angesehen werden, gemäß der Studie von Foti et al. und diese wahrscheinlich auf den Menschen übertragen. Eine Übertragung kann entweder über direkten Kontakt mit den Eseln oder durch den Verzehr von Eselmilch stattfinden, v.a. da Eselmilch von Personen mit Hypersensitivität gegenüber Kuh-, Schaf- und Eselmilch immer mehr verzehrt wird (Carroccio et al. 2000) und MRSA bereits aus Eselmilch aus Sizilien isoliert werden konnte (Naccari et al. 2009).

2.5.3.5 Geflügel

In Belgien konnten LA-MRSA, des ST398, erstmals bei klinisch gesunden Masthähnchen isoliert werden. Bei fünf von 39 Hähnchenfarmen wurden MRSA aus Nasenhöhlen- und Kloakenabstrichen nachgewiesen. Von zehn Isolaten des ST398 wurde der *spa*-Typ untersucht und acht konnten dem *spa*-Typ t011, mit SCC IV und V und zwei Isolate dem *spa*-Typ t567, mit *SCCmec* III zugeordnet werden (Nemati et al. 2008).

Persoons et al. untersuchten in Belgien 50 Legehennen und 75 Broiler und konnten bei acht Broilern, aus zwei Farmen, MRSA isolieren. Die MRSA wurden als ST398 mit *spa*-Typ t1456 identifiziert, welcher ein typischer Geflügelstamm ist. Insgesamt liegt die Besiedelung in den positiven Betrieben zwischen 20 bis 100 % (Persoons et al. 2009).

In niederländischen Schlachthöfen wurde bei 6,9 % der untersuchten Hähnchen und 5,6 % des Schlachthofpersonals MRSA nachgewiesen. Davon gehörten 70 % dem ST398, mit *t011* und 30 % dem ST9, mit *spa*-Typ *t1430* an (Mulders et al 2010).

2.5.3.6 Kleintiere

Über MRSA wurde bei Kleintieren erstmals in den 70ern berichtet und 1972 erstmals in Nigeria bei zwei gesunden Hunden nachgewiesen (Ojo 1972, Devriese et al. 1975, Hartmann et al. 1997, Shimizu et al. 1997, Pak et al. 1999).

In Tierkliniken und Tierarztpraxen überwiegen in Deutschland der ST-22 (Barmin-Stamm). Jedoch wurden auch die ST-1, ST-8, ST-80, ST-254 und ST-239 nachgewiesen (Loeffler et al. 2010). An der Freien Universität Berlin wurde eine Infektionsrate mit MRSA, meist von Wunden, bei 7,5 % der Hunde, 10 % der Katzen, 2,3 % der untersuchten Ziervögel, sowie Kaninchen, Meerschweinchen, einer Schildkröte, einem Papagei und einer Fledermaus, festgestellt. Die Isolate wurden fast alle dem ST-22, mit *SCC_{mec}* Typ IV, sowie je einmal ST 239, der als HA-MRSA gilt und dem Barnim-Stamm, sowie eines nahen Verwandten dieses Stammes zugeordnet (Walther et al. 2008).

Der ST-22 ist ein in Krankenhäusern sehr verbreiteter HA-MRSA und kommt auch in Tierkliniken vor. Dies lässt auf eine Übertragung von MRSA von Haustieren auf den Menschen schließen (O'Mahony et al. 2005, Strommenger et al. 2006, Boost et al. 2007, Sing et al. 2008, Loeffler et al. 2010) und wurde durch Nachweis der direkte Übertragung von einer Katze auf ihren Besitzer bestätigt (Vitale et al. 2006). Ein weiterer Fall der MRSA-Übertragung von einer Katze auf ihre Besitzer beschreiben Sing et al. (2008). Sowohl bei einer Krankenhauspatientin, mit einem tiefen rezidivierenden Abszess, als auch bei ihrem klinisch gesunden Ehemann und ihren Kindern, wurde der *spa*-Typ 131 mit *SCC_{mec}* Typ IV isoliert. Der Abszess heilte erst ab nachdem die Katze saniert wurde (Sing et al. 2008).

Loeffler et al. untersuchten 704 Hunde und 540 Katzen, von denen 15 Hunde und acht Katzen MRSA-positiv waren, mit ST-22. Als Risikofaktoren wurden Antibiotikabehandlungen, Aufenthalt in Tierkliniken, Vorhandensein von Koagulase-positiven Staphylokokken und chronische Erkrankungen angegeben (Loeffler et al. 2010). Auch in England konnten sie MRSA des Types EMRSA-15 bei Kleintieren, ihren Besitzern und Tierärzthelfer nachweisen (Löffler et al. 2005).

In Frankreich wurden bei 23 von 1250 Koagulase-positiven Staphylokokken-Isolate von Katzen und Hunden MRSA identifiziert. Darunter waren Tiere mit Hautinfektionen, Otitis,

Harnwegsinfektionen, Rhinitis, Gelenks- und Vaginalinfektionen. Von den 23 Isolaten konnten 16 dem „Lyon-Klon“ mit *agr*-I, *SCCmec* Typ-IV, *spa*-Typ t008 oder verwandten t-024, t068, t622 oder t1171, zugeordnet werden (Haenni et al. 2011). Der „Lyon-Klon“ ist der am Häufigsten in Frankreich vorkommende HA-MRSA (Dauwalder et al. 2008, Haenni et al. 2011). Bei einem Hund konnte die Infektion auf seinen, im Krankenhaus arbeitenden Besitzer zurückgeführt werden. Die restlichen Isolate konnten dem „Geraldine-Klon“, welcher für über 7 % der invasiven MRSA-Fälle in Frankreich verantwortlich ist sowie (Dauwalder et al. 2008, Robert et al. 2011, Haenni et al. 2011), dem CC398, den humanen, PVL-positiven Isolat, USA 300 und dem Barmin Klon, zugeordnet werden. Bisher wurden MRSA des ST398 nur bei Haustieren mit Kontakt zu Schweinen oder Livestock-Farmen nachgewiesen. Von den untersuchten Hunden hatte allerdings keiner Kontakt zu Farmtieren. Es wiesen sogar zwei der ST398 Isolate den „Cluster Typ B“ auf (*sak*, *chp* und *scn*) welcher ein humaner Virulenzfaktor ist (Witte et al. 2007, Haenni et al. 2011). Somit konnte auch keine Übertragung von MRSA von Menschen auf Haustiere bestätigt werden (Haenni et al. 2011).

2.5.3.7 Zootiere

MRSA wurden bisher in drei Fällen bei Zootieren nachgewiesen. Ein afrikanisches Elefantenkalb mit einer Hautinfektion, im Zoo von San Diego/ Kalifornien, wurde wahrscheinlich von drei seiner Pfleger mit MRSA infiziert. Die Wundisolate des Elefanten und Nasentupfer der Pfleger konnten dem Stamm USA 300 zugeordnet werden. Dies ist der in den USA am häufigsten vorkommende Stamm in Verbindung mit CA-MRSA.

In einem anderen Zoo wurden MRSA aus dem Panseninhalt eines Mufflons und aus einer Kronsaumfistel eines indischen Nashorns isoliert (Vercammen et al. 2010).

2.6 Resistenzen

Die fortschreitende Problematik der Resistenzbildung von *S. aureus* beruht auf seiner hohen Tenazität und kurzen Generationszeit. Jeder Antibiotikaeinsatz fördert den Selektionsdruck und das Risiko der Resistenzbildung (Kayser et al. 1998).

Zu Beginn der 40er Jahre war Penicillin G noch ein wirksames Antibiotikum gegen *S. aureus*. Jedoch entwickelten die Staphylokokken die Fähigkeit beta-Laktamasen zu bilden und schon im Jahre 1946 galten 60 % der isolierten *S. aureus* als Penicillin G resistent (Lyon et al. 1987), da sie durch das Enzym beta-Lactamase die Hydrolyse des beta-Lactamringes bewirken. So wurde im

Jahre 1960 das beta-Lactamase stabile, halbsynthetische Penicillinderivat Methicillin auf den Markt gebracht, da sich Penicillin G resistente-*S. aureus* zunächst im Krankenhaus und dann in der Bevölkerung rasch verbreitete. Doch die Methicillinresistenz trat bereits zu Beginn der 1960er Jahre auf. Zuvor kam es bereits in den 1940er Jahren zur Sulfonamidresistenz von *S. aureus* (Lode et al. 2010).

Die beta-Laktam Antibiotika wurden 1928 vom Engländer Alexander Fleming als erste Antibiotika entdeckt (Kayser et al. 2001). Sie wirken bakterizid und die namensgebende Struktur ist der viergliedrige beta-Laktamring. Der Wirkmechanismus beruht auf der irreversiblen Hemmung der Transpeptidasen, die für die Quervernetzung der Peptidoglycanstränge verantwortlich sind (Herdegen et al. 2008). Die zugrundeliegenden Resistenzgene sind *BlaZ*, *BlaR* und *BlaL*. Die Wirkung beruht auf der kovalenten Bindung an die penicillinbindenden Proteine (PBP). Somit wird die Peptidoglycansynthese verhindert und kein Murein mehr gebildet. Das Murein ist aber essentiell für die Stabilität der Bakterienzellwand. (Kayser et al. 2001). Außerdem werden PBPs direkt gehemmt, sodass es zum Untergang der Bakterienzelle kommt (Kroger et al. 2002).

Durch die Bildung der beta-Lactamase durch *S. aureus* kommt es zur Hydrolyse des beta-Laktam-Ringes und somit zur Inaktivierung der beta-Laktam Antibiotika (Lode et al. 2010). Mutationen und Membranveränderungen führen zur verminderten Aufnahme der Antibiotika in die Zelle und zu deren Inaktivierung durch eine verminderte Affinität zu den PBPs (Herdegen et al. 2008). Die antibakterielle Aktivität, sowie das Wirkspektrum der beta-Laktame wird durch die Affinität zu den PBPs, die beta-Laktamase-Stabilität und die Penetrationseigenschaft, die auf die Porine in der äußeren Membran zurückzuführen ist, bestimmt (Lode et al. 2010).

Die Methicillinresistenz der MRSA beruht auf dem *mecA*-Gen, das zur Bildung des PBP2 führt. *S. aureus* ist in der Lage die PBP Typen 1-4 zu bilden. Der Subtyp PBP2a hat eine 1000x geringere Affinität an beta-Lactame zu binden und führt somit, durch die Aufrechterhaltung der Funktion der PBPs der Bakterienzelle, zu deren Überleben (Chambers et al. 1997, Pinho et al. 2001, Deurenberg et al. 2007).

Die meisten porcinen ST398 verfügen neben dem *mecA*-Gen über das beta-Laktam-Resistenzgen *blaZ* und die Tetracyclinesistenzgene *tet(M)*, *tet(K)* und *tet(L)*. Des Weiteren können häufig die Gene *dfrK* oder *dfrG*, welche die Trimethoprimresistenz codieren sowie die Gene *erm(A)*, *erm(B)* und *erm(C)* der Macrolid/ Lincosamid-Resistenz bei MRSA von Schweinen isoliert werden (Kadlec et al. 2009).

Antibiotikum	Wirkort	Wirkart und Resistenzbildung	Genen	Autor, Jahr
Tetracykline (z.B. Doxycyclin, Tetracyclin,...)	30-S Untereinheit der Ribosomen	Verhindert Bindung der Aminoacyl-t-RNA an die ribosomale Akzeptorstelle und befördert Tetracyclin aus der Zelle über Effluxpumpensystem Folge Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese, bakteriostatisch	meist plasmidübertragen, tetM, tetK codiert, wirkt über Effluxpumpensystem	Kroker et al. 2002 Lyon et Skurray 1987 Walther et al. 2007
Glycylcycline (Tigecyklin) Reserveantibiotikum	blockiert die Anlagerung der tRNA an das Ribosom und wirkt bakteriostatisch	leitet sich von den Tetracyclinen ab, wird aber nicht durch die Resistenzmechanismen inaktiviert		Herdegen et al. 2008
Aminoglycoside (z.B. Gentamycin, Kanamycin)	30-S Untereinheit der Ribosomen	blockieren die kleine Ribosomenuntereinheit und führen zu Ablesefehlern während der Translation 1. Strukturveränderungen der Ribosomen verhindern AB Bindung 2. Amino- oder Hydroxygruppe enzymatisch verändert im periplasmatischen Raum Transport des AB in die Bakterienzelle wird verhindert 3. Veränderte Porine der Zellwand durch Punktmutation Hemmung der AB Aufnahme Folge "Nonsense"-Proteine werden gebildet, bakterizid	aacA-aphD	Kroker et al. 2002 Lyon et Skurray 1987 Walther et al. 2007 Herdegen et al. 2008
Glycopeptide (z.B. Vancomycin, Teicoplanin) Reserveantibiotika	hemmen die Zellwandsynthese	binden an die Acetyl-D-Alanin-D-Alanin-Endungen der Peptidoglycanmatrix, da falsches Peptid entsteht Übertragung der vanA-Determinante von VRE auf MRSA/ St.-aureus Veränderte Quervernetzung der Peptidoglycanmatrix um 1000x geringere Affinität zu Vancomycin Folge Stören die Quervernetzung durch sterische Blockade der an der N-Acetylmuraminsäure gebundenen Aminosäuren, wirken bakterizid	vanA und vanB codieren die Vancomycinresistenz vanZ ist das Teicoplaninresistenzgen	Lyon et Skurray 1987 Schäfer et al. 1998 Kroker et al. 2002 Fitzner et al. 2003 Herdegen et al. 2008

Makrolide (z.B. Erythromycin, Tilmicosin, Tylosin)	50-S Untereinheit der Ribosomen, an der Peptidyltransferase	Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese durch Blockade der Translokation Enzymatische Spaltung des Laktonringes mit Inaktivierung, Effluxmechanismen transportieren AB aus Zelle	erm(A), erm(B), erm© codiert, durch Transposons übertragen	Kroger et al. 2002
Lincosamide (z.B. Clindamycin, Lincomycin)	50-S Untereinheit der Ribosomen an der Peptidyltransferase	Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese durch Blockade der Translokation Enzymatische Methylierung der Nucleotide A2058, 23-s-rRNA ändert ihre Konformation Hauptangriffspunkt der AB beseitigt	Makrolide: über erm(A), erm(B), ermC mrs(A), mef(A) und mphC-Gene Lincosamid: lnu(A), vga(A) Plasmid-assoziiert übertragen	Geiss et al. 2003
Gyrasehemmer (z.B. Cipro-, Marbo-, Enrofloxacin)	hemmen dna-Gyrase (Topoisomerase II) und Topoisomerase IV	verhindert ringförmige Anordnung der DNS in einem Molekül, verhindert Überspiralisierung der DNS, so wird die Zellteilung gehemmt, bakterizid AS-Struktur der Topoisomerasen verändert, keine Komplexbildung mit dem AB möglich, Region QRDR verändert, Effluxpumpensystem (verringert auch Empfindlichkeit gegenüber Phenicolen, beta-Laktama und Tetracycline)	gyrA, gyrB, parC Gen norA	Wiedemann et Heising 1999 Kroger et al. 2002 Burgman et al. 2006
Pleuromutiline (z.B. Tiamulin)	Hemmen Proteinsynthese an 50-S Untereinheit der Ribosomen, am Peptidyltransferasezentrum	bakteriostatisch Veränderung der Struktur der ribosomalen Bindungsstelle oder unspezifisches Effluxsystem	Kreuzresistenz zwischen Pleuromutilinen und Linezoliden	Kroger et al. 2002 Miller et al. 2008
Fenicol (z.B. Florfenicol, Chloramphenicol)	Störung der Proteinbiosynthese der Ribosomen durch Störung der Peptidyltransferase	Effluxsystem Kreuzresistenz gegen Lincosamide, Fenicol, Oxazolidinone, Streptogramine und Pleuromutiline durch Veränderung der Bindungsstellen der AB an der 23S- rRNA	fexA-Gen, plasmid-übertragene cfr-Gen	Kroger et al. 2002 Kehrenberg et al. 2005 Kehrenberg et Schwarz 2006 Long et al. 2006

Sulfonamide und Trimethoprim	hemmend die Folsäuresynthese und somit die DNA Bildung der Bakterien	bakteriostatisch, bei Bakterien die Folsäure aus der Umwelt aufnehmen können vermehrte Bildung von p-Aminobenzoessäure für die Folsäurebildung verringerte Membranpermeabilität veränderte Dihydropterinsäure-Synthetase des Folsäuremetabolismus	Sulfonamide: Mutation des chromosomalen dhps(folP)-Gens Trimethoprim-Resistenz: dfrA	Kroker et al. 2002 Geisel et Schmitz 2003
Fosfomycin Reserveantibiotikum	hemmt die Synthese von Vorstufen der Zellwandbausteine			
Trimethoprim/Sulfonamid Kombinationen/ Cotrimazol	hemmen Folsäuresynthese der Bakterien und somit die DNS Bildung		dfrA	Herdegen et al. 2008
Ansamycine (Rifampicin)	hemmen die DNS-abhängige RNA-Polymerase und somit die Transkription, bakterizid			Herdegen at al. 2008
Chloramphenicol	hemmt die ribosomale Peptidyltransferase bakteriostatisch		cat-Gen, fexA-Gen	Herdegen at al. 2008
Oxazolidinone (Linezolid)	Hemmt die bakterielle Proteinsynthese an den 70-S Ribosomen durch Hemmung des Translationskomplexes		cfr	Herdegen at al. 2008
Streptogramine (Quinu-/ Dalbopristin) Reserveantibiotikum	Hemmen die bakterielle Proteinsynthese durch Hemmung der Transpeptidierung, bakterizid		cfr	Herdegen at al. 2008
Fusidinsäure-Na	Hemmen die bakterielle Proteinsynthese durch Hemmung der Ablösung der tRNAs, bakteriostatisch		fusC	Herdegen at al. 2008
Mupirocin	hemmt RNA-Synthetase		mupR	Lode et. Al. 2010

Tabelle 5: Antibiotika und bekannte Resistenzgene von *S. aureus*.

3. Material und Methoden

3.1 Projektaufbau

Die vorliegende Arbeit diente dazu, das Vorkommen von MRSA in Schweinebetrieben in Hessen, Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen zu untersuchen. Dabei wurde auch das Vorkommen von MRSA bei den Landwirten der Schweinebetriebe, den betreuenden Tierärzten, anwesenden Studenten und der Umgebung der Schweine analysiert. Die schweineassoziierten MRSA wurden mit MRSA von Krankenhauspatienten des Uniklinikums Heidelberg verglichen. Der Schwerpunkt der Dissertation lag auf dem Vergleich der schweineassoziierten MRSA mit denen der Krankenhauspatienten in Bezug auf die Genotypisierung mit Bestimmung der Virulenzfaktoren.

3.1.1 Schweinebetriebe

Als Schweinebetriebe wurden Ferkelerzeuger und Mastbetriebe mit geschlossener Betriebsstruktur, Betriebe mit Zukauf und ein Ökobetrieb auf MRSA untersucht.

3.1.1.1 Nasentupfer von Schweinen und Umgebungsproben

In jedem Betrieb mussten mindestens zehn Schweine durch die Entnahme eines Nasentupfers, beprobt werden, um genügend porcine MRSA für den Vergleich mit den MRSA der Krankenhauspatienten zu isolieren. Eine Ausnahme stellte ein Screeningbetrieb dar, der doppelt beprobt wurde, um die Untersuchungsmethoden zu testen. Eine Nummerierung aller entnommenen Proben erfolgte.

In Ferkelerzeugerbetrieben wurde versucht, falls es möglich war die Sauen zu fixieren, sowohl Ferkel als auch Sauen zu beproben. In Betrieben mit Schweinen im Flatdeck wurden auch diese untersucht und in Mastbetrieben erfolgte die Auswahl von Mastschweinen verschiedener Altersklassen (siehe Anhang) und Stallabteile zur Beprobung. Des Weiteren wurde in jedem Schweinebetrieb mindestens ein Sockentupfer und eine Staubprobe, sowie ein Tränketupfer und ein Tupfer der Spielzeuge entnommen und auf das Vorkommen von MRSA hin untersucht. Der erste Betrieb diente als Screeningbetrieb, um die Prävalenz von MRSA in den Betrieben sowie die Entnahme der Nasentupfer und Umgebungsproben besser einschätzen zu können.

In jedem Betrieb erfolgte die Erfassung des Medikamenteneinsatzes, mit besonderer Berücksichtigung des Antibiotikaeinsatzes bei den beprobten Tieren. Dies zielte darauf, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MRSA und der medikamentösen Behandlung der Tiere zu erkennen.

3.1.1.2 Nasentupfer von Landwirten, Tierärzten und Studenten der Veterinärmedizin

Die auf den Höfen anwesenden Landwirte, Tierärzte und Studenten der Veterinärmedizin (auch unter dem Begriff „schweineassoziierte Menschen“ zusammengefasst) wurden, auf freiwilliger Basis, gebeten ebenfalls einen Nasentupfer abzugeben und einen anonymisierten Fragebogen zu beantworten.

3.1.1.2.1 Personenbezogene Datenerhebung mit Hilfe eines Fragebogens

Um möglichst viel über den Gesundheitsstatus der beprobten Tierärzte, Landwirte und Studenten zu erfahren wurde ein spezifischer Fragebogen erstellt. Dieser ist im Anhang abgedruckt. Der Fragebogen ermöglichte es das Vorkommen von MRSA, bei den betroffenen Personen mit Schweinekontakt, sowohl mit ihren Schweinen als auch mit einem vorherigen Krankenhausaufenthalt in Verbindung zu bringen. Auch die Stammzuordnung als schweine- oder krankenhausaassoziiertes Stamm wurde mit Hilfe des Fragebogens erleichtert. Er erfragte vorangegangene Krankenhausaufenthalte, chronische und andere Erkrankungen, Medikamenteneinnahmen, Operationen, die Personengruppe und das Alter.

3.1.1.3 Beprobte Schweinebetriebe mit Betriebsdaten

Hessische Betriebe:

Schweinebetrieb Nr. 1:

Der Betrieb Nr. 1 lag in Hessen im Landkreis Gießen. Der Betrieb besaß zur Zeit der Beprobung 90 Sauen, 340 Aufzuchtplätze und 450 Mastplätze im geschlossenen System. Als Schweinerassen wurden neben Masthybriden, deutsche Edelschweine, Schweine deutscher Landrasse, Piétrain, Hampshire und Duroc gehalten. Sowohl der Maststall, das Flatdeck als auch die Sauen und Ferkel in der Abferkelung wurden beprobt. Die Ferkel erhielten Eisen nach der Geburt und auffällige Ferkel wurden mit Enrofloxacin behandelt. Dieser Betrieb diente als Screeningbetrieb und wurde nochmals als Betrieb Nr.6 beprobt, wobei bei der Nachuntersuchung eine Beprobung

des zuvor nicht beprobten Wartestalles und der neuen Saugferkel erfolgte. In dem Betrieb Nr. 1 ließen sich auch zwei Landwirte mit einem Nasentupfer beproben.

Schweinebetrieb Nr. 2:

Der Schweinebetrieb Nr. 2 war ein Mastbetrieb mit 800 Mastschweinen, in Hessen im Landkreis Bergstraße. Beprobte wurden neu angelieferte Absetzer und alle Altersklassen in der Mast. Die Schweine wurden mit 4 Wochen zugekauft und eingestallt. Der Durchgang erhielt bereits Doxycyclin (Pulmodox®, 40mg/kg KGW; 1,4 g/Tier/Tag) als Antibiotikum. Auch die Beprobung eines Landwirtes wurde durchgeführt.

Schweinebetrieb Nr. 3:

Der Mastbetrieb Nr. 3 lag in Hessen im Vogelsbergkreis. Der Betrieb besaß 800 Mastschweine und kaufte aus drei verschiedenen Betrieben Schweine hinzu. Die Tiere litten zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter Rhinitis atrophicans mit Pasteurellen- und Bordetellenbefall. Sie wurden mit Tetracyclin als Einstellbehandlung behandelt. Im Betrieb konnten die Mastschweine, zwei Landwirte und zwei Tierärzte beprobt werden.

Schweinebetrieb Nr. 4:

Der Betrieb Nr. 4 war ein Biobetrieb mit 300 Sauen, 1100 Aufzuchtplätzen und 120 Mastschweinen. Der Betrieb setzt keine Antibiotika ein und die Ferkel litten unter Kümern und Auseinanderwachsen. Beprobte wurden Saugferkel und Sauen. Der Betrieb Nr. 4 besaß auch eine Rinderhaltung, die neben den Schweineställen lag.

Schweinebetrieb Nr. 5:

Der Betrieb besaß 250 Sauen und 1600 Mastschweine im geschlossenen System. Der Betrieb lag in Hessen im Vogelsbergkreis. Die Ferkel bekamen Enrofloxacin sowie Amoxicillin und bei Einstallen in den Maststall Tetracyclin über eine Dauer von vier Tagen. Im Betrieb wurden die Sauen, Saugferkel und Absetzer sowie zwei Landwirte beprobt. Die Tiere litten unter Husten, dicken Gelenken und Kümern. Im Bestand wurden bereits *Mycoplasma hyopneumoniae* nachgewiesen.

Schweinebetrieb Nr. 6

Der Betrieb Nr. 6 war der Betrieb Nr. 1 und wurde als Screeningbetrieb anfangs verwendet, um alle Materialien zu testen und die Durchführbarkeit aller Labormethoden. In diesem Durchgang

wurden zusätzlich noch der Wartestall beprobt, drei Tierärzte sowie fünf Landwirte, die anwesend waren. Der Betrieb Nr. 6 und Nr. 1 wurden als ein Betrieb gewertet.

Schweinebetrieb Nr. 7:

Der hessische Betrieb Nr.7 lag im Vogelsbergkreis und verfügte über eine Ferkelerzeugung mit 700 Sauen. Die Sauen wiesen eine hohe Abort- und Totgeburtenrate auf. Im Betrieb wurden die Saugferkel, ein Landwirt und eine Studentin beprobt.

Schweinebetrieb Nr. 8:

Bei Schweinebetrieb Nr. 8 handelte es sich um den Maststall von Betrieb Nr. 7, allerdings an einem anderen Standort mit 1200 Tieren und mit weiterem Zukauf. Die beprobten Mastschweine litten unter einem Befall mit *Staphylococcus hyicus*. Im Betrieb konnten auch 3 Landwirte beprobt werden.

Schweinebetrieb Nr. 9:

Der Masttrieb lag im südhessischen Landkreis Darmstadt-Dieburg und kaufte alle 2-3 Wochen 120 Absetzer hinzu. Die beprobten Absetzer und die Mastschweine erhielten alle Amoxicillin (Aciphen®, 40mg/kg) als Einstallbehandlung. Im Betrieb wurden noch zwei Studenten sowie ein Tierarzt beprobt.

Schweinebetrieb Nr. 10:

Der Betrieb Nr. 10 lag im hessischen Schwalm-Eder Kreis und verfügt über eine Ferkelerzeugung mit 112 Sauen und 480 Mastschweinen. Die Tiere litten unter Gelenksproblemen und Abszessen. Beprobt wurden Saugferkel und Absetzer. Der beprobte Durchgang wurde mit Amoxicillin, Tetracyclin und Enrofloxacin behandelt. Alle Saugferkel erhielten außerdem als Erstbehandlung Tylosin. Im Betrieb konnten noch drei Landwirte und vier Studenten beprobt werden.

Schweinebetrieb Nr. 11:

Bei Betrieb Nr. 11 handelt es sich um einen hessischen Ferkelerzeuger mit 140 Sauen und 600 Ferkeln im Vogelsbergkreis. Der beprobte Durchgang mit Sauen und Ferkeln in der Abferkelung, Sauen im Deck- und Wartestall sowie einem Eber, litt unter Fieber, Husten, erhöhter Abortrate und mumifizierten Feten. Die Ferkel waren mit Penicillin (Veracin®) am zweiten und dritten

Lebenstag vorbehandelt worden. Im Betrieb wurde auch die Landwirtin sowie zwei Studentinnen beprobt.

Schweinebetrieb Nr. 12:

Betrieb Nr. 12 war in Hessen im Vogelsbergkreis ansässig und bestand aus einer Ferkelerzeugung- sowie einem Maststall mit 140 Sauen und 600 Mastschweinen. Alle Tiere husteten im Betrieb zur Zeit der Probenentnahme. Beprobt wurden die Sauen mit Saugferkeln sowie Absetzer im Flatdeck. Die beiden Landwirte des Betriebes sowie eine Studentin ließen sich auch mittels Nasentupfer beproben.

Schweinebetrieb Nr. 17:

Der hessische Betrieb Nr. 17 befand sich im Vogelsbergkreis und verfügte über eine Abferkelung mit 160 Sauen sowie einen Maststall mit 800 Plätzen. Beprobt wurden die Saugferkel und das Flatdeck. Auch zwei Landwirte und Studenten sowie ein Tierarzt ließen sich beproben. Als Antibiotikum erhielten die beprobten Schweine Amoxicillin sowie Enrofloxacin. Die Tiere zeigten Auseinanderwachsen, Kopfschiefhaltung, Juckreiz und wiesen eine verminderte Fruchtbarkeit auf.

Baden-Württembergische Betriebe:

Schweinebetrieb Nr. 13:

Der Jungsauenproduzent mit ca. 200 Tieren lag in Baden-Württemberg im Hohenlohekreis. Die Tiere erhielten zum Zeitpunkt der Beprobung keine Antibiotika. Neben den Jungsauen ließen sich noch ein Landwirt und ein Tierarzt beproben.

Schweinebetrieb Nr. 14:

Der Maststall Nr. 14 mit ca. 600 Tieren lag in Baden-Württemberg im Hohenlohekreis. Im Betrieb wurden die neu eingestellten Absetzer im Maststall sowie eine Landwirtin beprobt.

Nordrheinwestfälische Betriebe:

Schweinebetrieb Nr. 15:

Der Schweinebetrieb Nr. 15 befand sich in Nordrheinwestfalen in der Nähe von Mönchengladbach und verfügte über ca. 120 Sauen und ca. 600 Mastschweine. Im Betrieb

wurden Sauen mit Saugferkeln sowie Absetzer beprobt. Außerdem ließen sich auch zwei Landwirte beproben.

Schweinebetrieb Nr. 16:

Der Maststall mit ca. 600 Plätzen von Betrieb Nr. 16 lag in Nordrheinwestfalen in der Nähe von Mönchengladbach. Nasentupfer wurden von neu eingestellten Absetzern im Maststall entnommen. Im Betrieb ließen sich auch die beiden anwesenden Landwirte beproben.

Niedersächsische Betriebe:

Schweinebetrieb Nr. 18:

Der Betrieb Nr. 18 mit einer Ferkelerzeugung mit 600 Sauenplätzen befand sich im niedersächsischen Landkreis Vechta. Im Betrieb wurden die Saugferkel sowie der anwesende Landwirt beprobt. Die beprobten Tiere waren mit Penicillin vorbehandelt und der Betrieb kauft auch Schweine hinzu.

Schweinebetrieb Nr. 19:

Der Betrieb Nr. 19 im Landkreis Vechta verfügte über eine Sauenhaltung mit 600 Sauen sowie eine Mastanlage an einem weiteren Standort. Die beprobten Saugferkel waren alle mit Langzeitpenicillin vorbehandelt.

Schweinebetrieb Nr. 20:

Auch der Ferkelerzeuger Nr. 20 lag im Landkreis Vechta und besaß 130 Sauen. Die beprobten Saugferkel wurden bereits mit Penicillin behandelt.

Schweinebetrieb Nr. 21:

Der Maststall sowie die Abferkelung des Betriebes Nr. 21 aus dem Landkreis Vechta wurde beprobt. Der Betrieb besaß zum Beprobungszeitpunkt 60 Sauen, 400 Mastschweine und kaufte Schweine hinzu. Alle Saugferkel bekamen am ersten Lebenstag Penicillin. Beprobt wurden in diesem Betrieb die Mastschweine und Saugferkel.

Schweinebetrieb Nr. 22:

Auch Betrieb Nr. 22 mit einer Abferkelung mit 80 Sauen und ca. 400 Schweinemastplätzen lag im Landkreis Vechta. Der Betrieb kaufte Schweine zu. Die beprobten Saugferkel wurden mit

Penicillin am ersten Lebenstag behandelt und im Betrieb ließ sich neben den Schweine auch ein Landwirt beproben. Der Betrieb besaß auch noch eine Entenmast, die neben dem Schweinestall lag.

Schweinebetrieb Nr. 23:

Der Betrieb Nr. 23 verfügte über 260 Sauen mit Eigenremontierung und lag im Landkreis Vechta. Die Beprobten Sauen und Saugferkel erhielten am ersten Lebenstag Langzeitpenicillin.

Schweinebetrieb Nr. 24

Die Abferkelung mit 130 Sauen und der Maststall mit 400 Plätzen lag im Landkreis Oldenburg. Beprobt wurden Saugferkel und zwei Landwirte. Die Tiere wurden am ersten Lebenstag mit Penicillin behandelt. Der Betrieb kaufte auch Schweine hinzu.

Schweinebetrieb Nr. 25:

Der Betrieb Nr. 25 im Landkreis Vechta besaß 400 Mastplätze. Die neu eingestellten Absetzer, die beprobt wurden, erhielten Amoxicillin. Auch von dem anwesenden Landwirt konnte eine Nasentupferprobe entnommen werden.

Schweinebetrieb Nr. 26:

Die Ferkelerzeugung mit 100 Sauen und Mast von Betrieb Nr. 26 lag im Landkreis Vechta. Der Betrieb kauft Jungsauen sowie Eber zu. Beprobt wurden neu eingestellte Absetzer im Flatdeck, die gerade mit Amoxicillin behandelt wurden, da ein Streptokokkenproblem vorlag

Schweinebetrieb Nr. 27:

Der Betrieb Nr. 27 befand sich im Landkreis Vechta und verfügte über 250 Sauen, 1000 Flatdeckplätze und 1500 Mastschweine. Beprobt wurden die Schweine im Flatdeck, ein Landwirt und ein Tierarzt. Die Tiere erhielten am ersten und vierten Lebenstag Penicillin und wurden nach dem Absetzen immer mit Amoxicillin behandelt, da auch hier ein Streptokokkenproblem vorlag.

Schweinebetrieb Nr. 28:

In Betrieb Nr. 28 aus dem Landkreis Vechta wurden Saugferkel, Tiere im Flatdeck und die beiden Landwirte beprobt. Der Betrieb verfügt über 1600 Flatdeckplätze, 600 Sauen und 1800

Mastplätze. Die Tiere erhielten Amoxicillin am ersten Lebenstag. Der Betrieb verfügt außerdem über eine Pferdezucht und Legehennen.

In allen untersuchten Betrieben wurde den Saugferkeln Eisen verabreicht zur Vorbeugung einer Eisenmangelanämie und eine regelmäßige Entwurmung der Tiere vorgenommen. Die erfassten Antibiotikagaben und Betriebsdaten entsprechen den Angaben durch die Landwirte des jeweiligen Betriebes.

Betriebsnummer	Betriebsart	Schweineanzahl	Medikamenteneinsatz im beprobten Durchgang
1	Ferkelerzeugung, Flatdeck+ Mast	90 Sauen 340 Ferkel 450 Mast.	Enrofloxacin
2	Mast	800 Mast.	Doxycyclin
3	Mast	800 Mast.	Tetracyclin
4	Ferkelerzeugung, Flatdeck+ Mast	300 Sauen 1100 Ferkel 120 Mast	-
5	Ferkelerzeugung, Flatdeck Mast	250 Sauen 1600 Mast.	Enroflocacin u. Amoxicillin +Tetracyclin
6=1	Ferkelproduktion, Flatdeck+ Mast	90 Sauen 340 Ferkel 450 Mast	Enrofloxacin
7	Ferkelerzeugung+ Flatdeck (Mast an anderem Standort)	700 Sauen	Keine Angaben
8=7b	Maststall von Betrieb 7	1200 Mast	Keine Angaben
9	Mast	Zukauf von 120 Absetzern alle 2-	Amoxicillin
10	Ferkelerzeugung, Flatdeck, Mastschweine	112 Sauen 480 Mast	Tylosin +Amoxicillin, Tetracyclin und Enrofloxacin
11	Ferkelerzeuger, Flatdeck	140 Sauen 600 Ferkel	Penicillin
12	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	140 Sauen 600 Mast	Keine Angaben
13	Sauenproduzent	200 Jungsauen	-
14	Mast	600 Mast	Keine Angaben
15	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	120 Sauen 600 Mast	Keine Angaben
16	Mast	600 Mast	Keine Angaben

Betriebsnummer	Betriebsart	Schweineanzahl	Medikamenteneinsatz im beprobten Durchgang
17	Ferkelerzeuger, Flatdeck, Mast	160 Sauen 800 Mast	Amoxicillin, Enroloxacin
18	Ferkelerzeuger, Flatdeck	600 Sauen	Penicillin
19	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	600 Sauen	Penicillin
20	Ferkelerzeuger	130 Sauen	Penicillin
21	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	60 Sauen 400 Mast	Penicillin
22	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	80 Sauen 400 Mast	Penicillin
23	Ferkelerzeuger	260 Sauen	Penicillin
24	Ferkelerzeuger, Mast	130 Sauen 400 Mast	Penicillin
25	Mast	400 Mast	Amoxicillin
26	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	100 Sauen	Amoxicillin
27	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	250 Sauen 1000 Flatdeck 1500 Mast	Penicillin +Amoxicillin
28	Ferkelerzeuger, Flatdeck+ Mast	600 Sauen 1600 Flatdeck 1800 Mast	Amoxicillin

Tabelle 6: Betriebsdaten der untersuchten Betriebe.



Abbildung 10: Lage und Anzahl der untersuchten Betriebe in Deutschland, sortiert nach Bundesländern.

3.2 Schweineassoziierte Proben aus dem europäischen Ausland

Zum Vergleich der isolierten MRSA, der beprobten deutschen Schweinen, mit MRSA von Schweinen aus anderen europäischen Ländern, wurden Universitäten in der Schweiz, Dänemark, Spanien und den Niederlanden, die zuvor Veröffentlichungen über das Vorkommen von MRSA bei Schweinen verfasst hatten, angeschrieben, ob es möglich sei fünf schweineassoziierte MRSA-Isolate von Ihnen zu erhalten. Die Isolate wurden in Amies-Medium von Prof. Perreten und Prof. Huber aus der Schweiz, Dr. Hasmann aus Dänemark, Prof. Torres aus Spanien und Prof.

Fluid aus den Niederlanden gesendet. Die Proben konnten dann analog der selbst entnommenen Nasentupfer weiter untersucht werden, um eine gute Vergleichbarkeit mit den selbst entnommenen deutschen porcinen MRSA-Isolaten zu gewährleisten.

Land	Landwirt: stationär im Krankenhaus	Schwein	Staub	Ohne nähere Angaben
Spanien: Prof. Torres	3	2	0	0
Dänemark: Dr. Hasmann	0	3	2	0
Niederlande: Prof. Fluid	0	1	0	3
Schweiz: Prof. Perreten	0	6	0	0
Schweiz: Prof. Huber	0	5	0	0

Tabelle 7: MRSA-Isolate aus Europa mit Herkunft.



Abbildung 11: Herkunft der europäischen porcinen MRSA-Isolate.

3.3 Krankenhauspatienten

Proben von Patienten, die im Jahr 2012 in das Uniklinikum Heidelberg eingeliefert wurden mit MRSA, konnten in die Dissertation aufgenommen werden. Die MRSA der Krankenhauspatienten wurden isoliert und mit denen der schweineassoziierten Isolate verglichen. Dabei konnten Isolate von kolonisierten Patienten und von Patienten mit MRSA in primär sterilen Materialien (z.B. Urin, Blut, OP-Wunden) unterschieden werden.

3.4 Probenentnahme und Transport

3.4.1 Nasentupfer der Schweine

Die Nasentupfer von Schweinen wurden mit einem sterilen Tupfer (größerer Tupfer: Fa. Deltalab, Rubi, Spanien/ kleinere Tupfer: Fa. Copan, Brescia, Italien) entnommen. Beide verwendeten Tupfersysteme verfügten über Amies Medium und unterschieden sich lediglich in ihrer Größe. Der kleinere Tupfer der Firma Copan wurde aus Tierschutzgründen für unter drei Wochen alte Ferkel verwendet. Die Nasentupfer wurden mindestens 2 cm tief, mit einer kreisenden Bewegung, in die Nasenöffnung der Schweine eingeführt. Bei neugeborenen Ferkeln wurde der Tupfer so weit wie anatomisch möglich, mindestens bis zum Verschwinden des Wattebauches, in die Nase eingeführt, um aus Tierschutzgründen Verletzungen und Nasenbluten zu vermeiden. Größere Schweine konnten dabei mit Hilfe einer Oberkieferschlinge (Fa. Schippers, Kerken, Deutschland) fixiert werden. Ferkel und kleinere Mastschweine wurden von einer zweiten Person auf den Arm genommen und festgehalten. Bei der Probenentnahme musste darauf geachtet werden, einen Kontakt des Tupfers mit der Rüsselscheibe und der Kopfhaut zu vermeiden.

3.4.2 Staubproben

Staubproben wurden mit Hilfe eines autoklavierten Pinsels (Fa. Swing Color, Mannheim, Deutschland, Pinsel: Aqua) entnommen und in ein steriles verschließbares Laborgefäß verbracht (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland, Inhalt: 50 ml). Der Staub stammte aus der tiernahen Umgebung von den Buchtenabtrennungen, Fensterbänken, Lampen, Leitungen und Lüftungen, wobei darauf zu achten war möglichst wenig Futterstaub aus der Umgebung der Futterkrippen zu sammeln. Eine Kennzeichnung der Staubproben erfolgte entsprechend ihrer Herkunft. Dabei mussten alle Probenröhrchen gleichmäßig bis zur Markierung (s. Abbildung 12) gefüllt werden, um ein gleichmäßiges Staubvolumen aus den verschiedenen Betrieben zu erhalten. War der Stall frisch gereinigt und desinfiziert worden, wurde trotzdem versucht genügend Staub für die Untersuchung zu gewinnen. Der Staub entstammte dann v.a. den Lampen, Fensterbänken, Leitungen sowie höher gelegenen und vergessenen Bereichen.

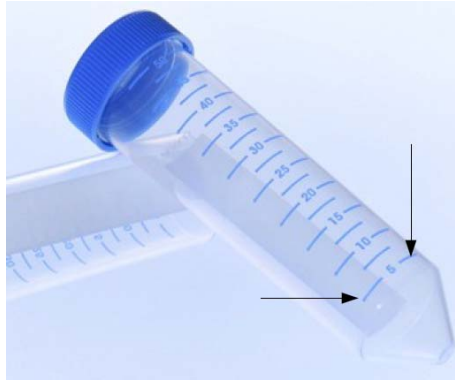


Abbildung 12: Das Laborgefäß (Fa. Greiner bio-one) wurde bis zur Markierung mit Staub gefüllt.

3.4.3 Sockentupfer

Sockentupfer (Fa. Finnimport GmbH, Hamburg, Deutschland, PP-16-Schuhschutz) wurden über Einwegstiefelüberzieher (Fa. Securesse, Heilsbronn, Deutschland, PE-Überstiefel), unter Verwendung von Einweghandschuhen (Microflex Nitrile Gloves, Den Hague, Niederlande), angezogen. Das Sockentupferpaar diente dazu den gesamten Stallgang und die Abteile, mit den zu beprobenden Tieren abzugehen, damit Staub des Bodens anhaftete. Die Sockentupfer wurden nach dem Ausziehen in einem verschließbaren Stomacherbeutel (Fa. Zipp, Deutschland, 1 l Beutel) verpackt.

3.4.4 Tränken

In den Betrieben wurden auch Tränken auf das Vorkommen von MRSA hin untersucht. Dabei wurden vier bis fünf Tränken als gepoolte Proben beprobt und die Tränkenippel mit einem sterilen Tupfer (Fa. Deltalab, Rubi, Spanien) abgestrichen.

3.4.5 Spielzeuge

Die Spielzeuge der Schweine wurden mit einem sterilen Tupfer (Fa. Deltalab, Rubi, Spanien) von allen Seiten beprobt. Dabei konnten immer vier bis fünf Spielketten als gepoolte Proben mit einem Tupfer abgestrichen werden. Es wurde darauf geachtet, falls Spielzeuge unterschiedlicher Art wie Bälle oder Ketten und unterschiedlicher Materialien, wie Plastik, Holz, Metall vorhanden waren, alle zu beproben.

3.4.6 Landwirte, Tierärzte und Studenten

Auf den Höfen anwesende Landwirte, Tierärzte und Studenten der Veterinärmedizin, wurden gebeten auf freiwilliger Basis einen Nasentupfer (Fa. Deltalab, Rubi, Spanien) abzugeben und den ihnen ausgehändigten Fragebogen (s. Anhang) auszufüllen. Der Nasentupferentnahme führten die betroffenen schweineassoziierten Personen selbst durch. Dabei wurde der Tupfer mit kreisenden Bewegungen mindestens 2 cm tief in die Nase eingeführt, unter Vermeidung von Hautkontakt, analog zu der Nasentupferentnahme bei den Schweinen.

3.4.7 Probentransport

Die Proben aus Hessen, Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen konnten noch am Tag der Probenentnahme in das Hygienelabor des Universitätsklinikums Heidelberg, Department für Infektiologie, Sektion Krankenhaus und Umwelthygiene verbracht und untersucht werden. Alle Proben aus Niedersachsen wurden am Tag nach der Probenentnahme im gleichen Labor untersucht, da MRSA in den Tupfersystemen mindestens 72h sicher überleben können.

3.4.8 Krankenhauspatienten

Tupferproben (Fa. Deltalab, Rubi, Spanien) von kolonisierten Patienten und von Patienten mit MRSA in primär sterilen Materialien (Urin, Blut, Operationswunden) des Uniklinikums Heidelberg mussten von den behandelnden Ärzten entnommen werden. Alle Patienten waren bereits MRSA-positiv getestet worden oder verdächtig und dann auch positiv. Die Proben wurden am Tag der Probenentnahme in das Hygienelabor des Universitätsklinikums Heidelberg, Department für Infektiologie, Sektion Krankenhaus und Umwelthygiene verbracht und auf MRSA untersucht.

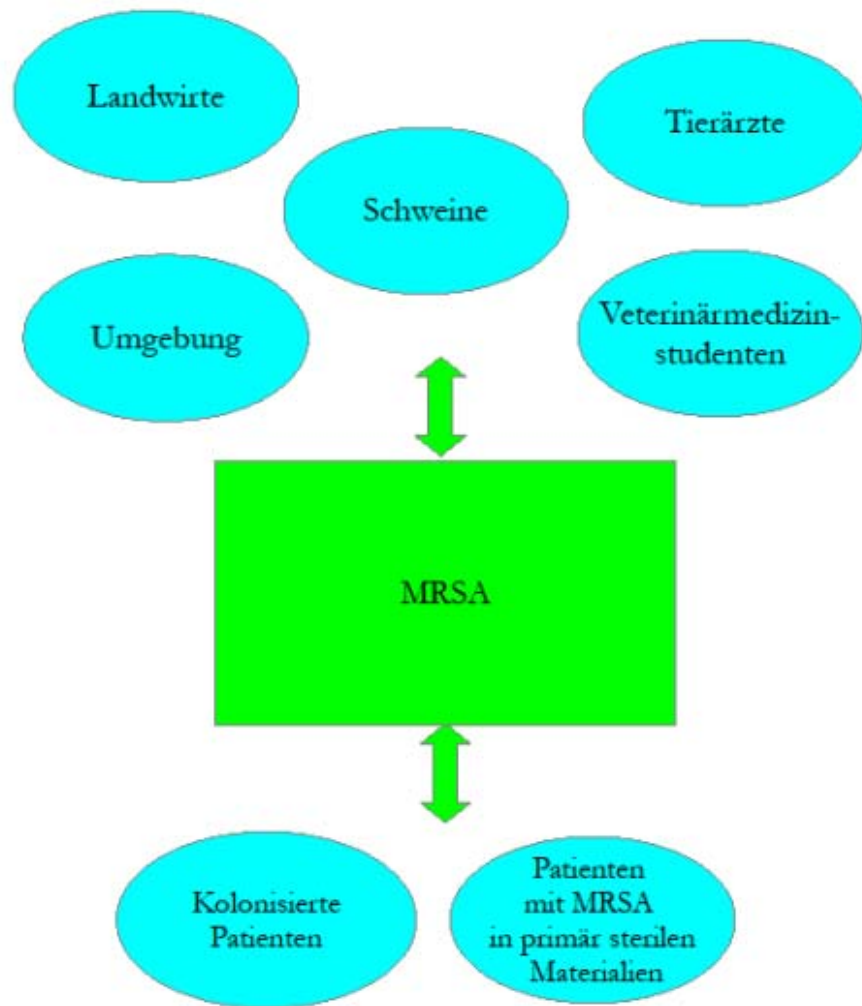


Abbildung 13: Herkunft der MRSA-Isolate.

3.5 Bakteriologische Untersuchung

3.5.1 Anzucht und Isolierung von MRSA

3.5.1.1 Nasentupfer der Schweine, Landwirte, Tierärzte, Studenten und die übersandten MRSA-Tupfer aus dem Ausland

Die Nasentupfer wurden nach Ankunft im Labor in ein Anreicherungsmedium, der sogenannten CASO-Bouillon (Uniklinikum Heidelberg, Deutschland, 10 ml sterile CASO-Bouillon), verbracht. Dabei mussten die Tupfer etwa 30 Sekunden, in mit CASO-Bouillon gefüllten, sterilen Reagenzgläsern unter Rühren, ausgedrückt werden. Die CASO-Bouillon war dann aerob, im

Brutschrank bei 37 °C +/- 1°, 24 h lang, zu bebrüten. Eine Trübung der CASO-Bouillon nach 24h zeigte bakterielles Wachstum an.

Die CASO-Bouillon wurde mittels Dreißenausstrich, nach 24h Bebrütung, bei 37 °C +/- 1 °C, mit einer sterilen Einwegöse (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10µl), auf einen MRSA-ID ChromAgar (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, BBL ChromAgar MRSA-II), und noch auf einem COS-5 %-Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Columbia Agar with 5 % Sheep Blood) zur Kontrolle der Ausstrichtechnik und des Bakterienwachstums, ausgestrichen. Vor dem Ausstreichen musste die CASO-Bouillon gevortext (Kurt Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland, Vortexer) werden. Der ChromAgar diente dem spezifischen Nachweis von MRSA und der Cefoxitin-Resistenz. Die Agar wurden 24h lang bei 37 °C +/- 1 °C, bebrütet.

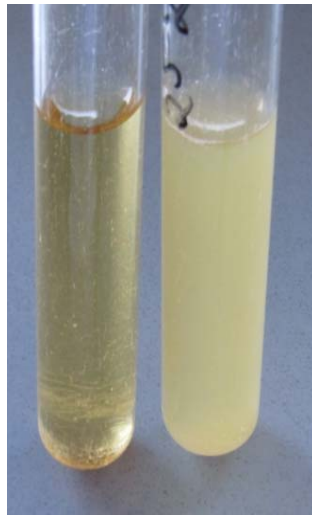


Abbildung 14: Unbeimpftes CASO-Röhrchen (links) und beimpfte, bebrütete getrübbte CASO-Bouillon mit Bakterienwachstum (rechts).

3.5.1.2 Anzucht der Tränketupfer und Tupfer der beprobten Spielzeuge

Diese Tupferproben wurden analog zu den Nasentupfer der Schweine angezüchtet.

3.5.1.3 Anzucht der Sockentupfer

Die Sockentupfer mussten in ein großes steriles Glasgefäß überführt und komplett mit CASO-Bouillon übergossen werden. Das Glasgefäß wurde mit einer sterilen Aluminiumfolie abgedeckt und die Sockentupfer aerob bei 37°C +/- 1 °C für 24 h bebrütet.

Die weitere Anzucht auf dem MRSA-ID Agar und der COS-5 %-Agarplatte erfolgte entsprechend der Anzucht der porcinen Tupferproben. Allerdings konnte die CASO-Bouillon nicht gevortext werden, sondern wurde ca. 20 Sekunden mit einer sterilen Einwegöse (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10 µl) umgerührt.



Abbildung 15: Mit CASO-Bouillon aufgefülltes steriles Glasgefäß mit Sockentupfer (links) und Staubröhrchen mit CASO-Bouillon (rechts).

3.5.1.4 Anzucht der Staubproben

Das Probengefäß mit dem enthaltenen Staub musste auch mit CASO-Bouillon aufgefüllt und einer sterilen Alufolie abgedeckt werden. Der Staub wurde aerob bei 37°C +/- 1 °C für 24h bebrütet. Die weitere Anzucht auf dem MRSA-ID Agar und dem COS- 5 %-Agar erfolgte wieder entsprechend der Anzucht der porcinen Tupferproben. Allerdings konnte auch die CASO-Bouillon mit dem Staub nicht gevortext werden, sondern wurde ca. 20 Sekunden lang mit einer sterilen Einwegöse (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10 µl) umgerührt.

3.5.1.5 Anzucht der MRSA von Krankenhauspatienten

Die Proben der Krankenhauspatienten entstammten der täglichen Diagnostik des MRSA-Labors, des Departments für Infektiologie, Sektion Krankenhaus- und Umwelthygiene, des Universitätsklinikums Heidelberg. Die Tupferproben wurden analog zu den Schweineproben

verarbeitet. Um in der Diagnostik, zur besseren Patientenbehandlung, schnellere Ergebnisse zu erhalten mussten die Tupfer allerdings am Tag der Entnahme schon auf einer COS-5 %-Agarplatte, dem MRSA-ID Agar ausgestrichen und wie bei den Schweinen in der CASO-Bouillon ausgedrückt werden.

Alle drei Medien waren wiederum 24 h bei $37 \pm 1^\circ \text{C}$ zu bebrüten. Der sofortige Ausstrich auf dem MRSA-ID und der Kontrolle der Abstrichtechnik und dem Vorhandensein der Standardflora auf dem COS-5 %-Agar diente der schnelleren Erhaltung von vorläufigen Ergebnissen zur Behandlung der Patienten. Dies war bei den Schweineproben nicht nötig, da einerseits keine schnelle Behandlung der Schweine, wie bei den Krankenhauspatienten nötig war und andererseits aus Kostengründen.

Die CASO-Bouillon wurde nach 24 h analog der schweineassoziierten Proben abgelesen. Waren auf dem MRSA-ID Agar nach 24 h keine rosa Kolonien gewachsen, musste die getrübbte CASO-Bouillon analog zu der Untersuchung der porcinen Tupferproben auf einem MRSA-ID-Agar und zur Kontrolle der Ausstrichtechnik auf einem COS-Agar nochmals ausgestrichen werden.

Blut- und Urinproben konnten auf Grund des Infektionsrisikos nur von Ärzten und angestellten Mitarbeitern des Uniklinikums Heidelberg aufbereitet und dann analog zu den Tupferproben auf MRSA-ID-Agar und COS-5 %-Agar ausgestrichen werden.

Insgesamt wurden zwei Patientenpopulationen gebildet, eine mit MRSA in primär steriler Materie wie z.B. Blut, Urin, Operationswunden und eine mit einer MRSA-Kolonisation z.B. in der Nase oder auf der Haut.

3.5.1.6 Anzucht auf MRSA-ID und COS-Agar mit Auswertung

Zur Kontrolle der Anzuchttechnik und der Standardflora wurde die CASO-Bouillon nach 24h auch auf einer COS-5 %-Agarplatte ausgestrichen und dabei ein Dreißenausstich (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10 μl) angefertigt. Die COS-5 %-Agarplatten wurden 24 h bei $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ$, bebrütet.

Nach 24 h erfolgte das Ablesen der MRSA-ID- und der COS-5 %-Agarplatten. Waren auf dem MRSA-ID Agar rosa Kolonien vorhanden konnten sie als MRSA gewertet und weiter untersucht werden.

MRSA wachsen auch bei Anwesenheit von Cefoxitin, welches in dem MRSA-ID Agar enthalten ist und produzieren durch die Hydrolyse der chromogenen Substanzen rosafarbene bis hellviolette Kolonien. Nicht-MRSA Bakterien können andere chromogenen Substrate des ID-Agars verwerten wobei blaue bis blaugrüne Kolonien entstehen. Falls keine chromogenen

Substrate verwertet werden, wachsen weiße oder farblose Kolonien. Das Wachstum eines *S. aureus* auf CHROMagar MRSA-II lässt auf seine Oxacillin/ Methicillin-Resistenz schließen und dient der MRSA-Bestätigung (BD BBL™ CHROMagar™ MRSA, Becton Dickinson GmbH, <http://prod.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/DE-PA-257308.pdf>).

Dann wurden jeweils 1-3 rosa Kolonien von dem MRSA-ID Agar auf eine COS-5 %-Agarplatte, durch Dreiösendaustich, überimpft. Auf den COS-5 %-Agar musste ein Aztreonam Antibiotikaplättchen (Benex Limitex Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, Sensi-Disc Aztreonam) aufgebracht werden, um eine Reinkultur zu gewinnen und das Hämolyseverhalten der MRSA zu beurteilen.

Aztreonam gehört zu den Monobactamen und wirkt gegen gramnegative Bakterien. Es wurde als ein mit Aztreonam getränktes Plättchen auf die zuvor mit Dreiösendaustich beimpfte COS-5 %-Agarplatte aufgelegt und 24 h bei 37°C +/- 1 °C bebrütet. So konnte einer Überwucherung der MRSA durch gramnegative Bakterien, wie *Proteus* entgegengewirkt werden. Die somit angelegten Reinkulturen wurden später nach der biochemischen Testung, eingefroren.



Abbildung 16: COS-Agar mit Aztreonam.

3.5.1.7 Hämolyseverhalten

Das Wachstum in Reinkultur und das Hämolyseverhalten der MRSA wurde auf dem COS-5 %-Agar nach 24 h Bebrütung bei 37°C +/- 1 °C beurteilt und diente der Bestätigung der Spezies *S. aureus*.

S. aureus wächst auf COS-Agar nach ca. 18–24h bei 37°C +/- 1 °C als weiße bis goldgelbe mittelgroße, feuchte Kolonien, mit glatter, gewölbter Oberfläche und einem Durchmesser von 1-3 mm. Die Hämolyse von *S. aureus* kann in verschiedener Intensität auftreten. Das Alpha-Hämolysin führt zu einer vollständigen Hämolyse und das Beta-Hämolysin zu einer großflächigen unvollständigen Hämolyse (Quinn et al 2002, Selbitz 2007, Becker et al. 2009).

3.6 Biochemische Differenzierung

3.6.1 Katalasetest

Der durchgeführte Katalasetest zeigte die Anwesenheit des Enzyms Katalase an, da es sich bei *S. aureus* um Katalase-positive Staphylokokken handelt. Mit einer sterilen Einmalöse (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10 µl) wurden ein bis drei 24 h alte Kolonien von dem COS-5 %-Agar mit Aztreonam auf einen Objektträger übertragen. Dann erfolgte die Überschichtung mit einem Tropfen 3 %-igen Wasserstoffperoxids (H₂O₂).

Bei *S. aureus* kam es sofort zur Freisetzung von Sauerstoffbläschen, da bei Staphylokokken die vorhandene Katalase das Substrat Wasserstoffperoxid in Wasser und elementaren Sauerstoff spaltet. Der freiwerdende Sauerstoff wird als Gasbläschen sichtbar.

Der positive Katalasetest diente dem Nachweis von KPS, wie *S. aureus*, die schon durch ihr Wachstum auf dem MRSA-ID Agar und dem COS-Agar aufgefallen waren sowie durch einen positiven Pastorex-Staph-Plus Test (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland, Pastorex Staph-Plus) später identifiziert und bestätigt wurden (Standartarbeitsanweisung: Pohl, Mischnik, Sonntag, 2001).

3.6.2 Pastorex Staph-Plus Test

Der Pastorex Staph-Plus Test (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland, Pastorex Staph-Plus) diente der Unterscheidung zwischen *S. aureus* und KNS. Es handelt sich hierbei um einen Latex-Agglutinationstest zum gleichzeitigen Nachweis des Clumping-Faktors, des Protein A und der spezifischen Kapselpolysaccharide, als wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus*.

Zur Durchführung wurden eine bis drei gut isolierten Kolonien vom dem COS-5 %-Agar mit Aztreonam verwendet. Dabei sollten die Kolonien mindestens 24 h und höchstens 48h alt sein.

Er funktioniert indem rote Latexpartikel mit Fibrinogen und IgG-Antikörpern gegen das Protein A und monoklonalen Antikörpern gegen die Polysaccharidkapsel von *S. aureus* sensibilisiert wurden. Durch diese Kombination können MRSA-Stämme und auch solche Stämme, die nur wenig Protein A oder Clumping-Faktor produzieren, erkannt werden.

Bei Vorhandensein von mindestens einem Merkmal kam es zur, mit dem bloßen Auge zu erkennender, Agglutination. Der gleiche Test mit nicht sensibilisierten Latexpartikeln (Kontroll-Latex) musste negativ bleiben.

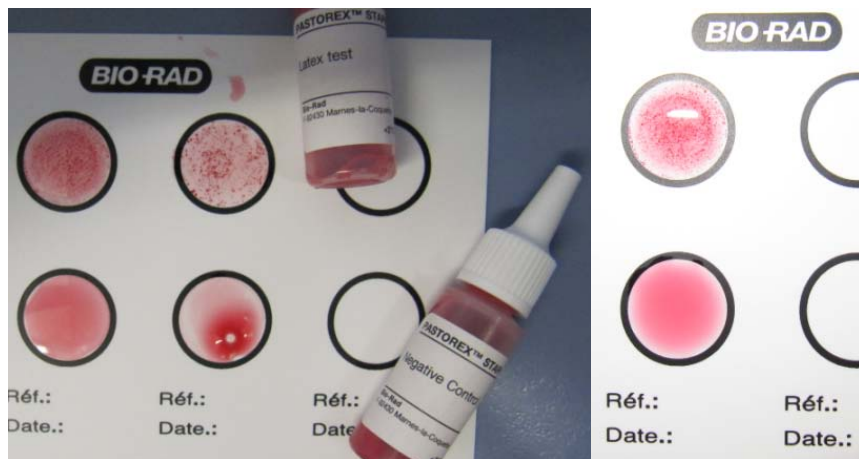


Abbildung 17: Pastorex-Staph-Plus Test mit Agglutination (obere Reihe) und Negativkontrolle (untere Reihe).

Um den Test durchzuführen wurden die Reagenzien gut gemischt und ein Tropfen des Testreagenzes in einen Kreis der Agglutinationskarte gegeben. Mit Hilfe eines Rührstäbchens (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland, Pastorex Staph-Plus) wurden ein bis drei Kolonien in das Latexreagenz verrieben und zehn Sekunden lang gemischt. Dann konnte die Karte (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland, Pastorex Staph-Plus) nach spätestens 30 Sekunden unter leichtem Schaukeln bewertet werden. Trat eine Agglutination ein wurde der gleiche Test mit der Negativkontrolle wiederholt.

Falsch positive Reaktionen sind allgemein in der Veterinärmedizin v.a. durch *S. hyicus* und in der Humanmedizin durch *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* und *S. intermedius* möglich. Falsch negative Ergebnisse waren möglich wenn zu wenig Material verwendet wurde. In seltenen Fällen gibt es *S. aureus* Kolonien, die weder Clumping-Faktor, Protein A noch Kapselpolysaccharide bilden.

Kritische Einflussgrößen
Falsch positiv
(Schwach) positive Reaktionen sind <i>möglich bei: S. lugdunensis, S. schleiferi, S. intermedius und S. hyicus</i>
Bei <i>S.-saprophyticus</i> kann es zu einer unspezifischen Aggregation von Latexpartikeln sowohl im Testreagenz als auch in der Negativkontrolle kommen
Kreuzreaktionen mit bestimmten Streptokokken mit Affinität zum Fc-Fragment von Immunglobulinen sind möglich
Kreuzreaktionen mit bestimmten Streptokokken mit Affinität zum Fc-Fragment von Immunglobulinen ist möglich
Unspezifische Reaktionen bei einer Latexagglutination mit z.B. <i>E. coli</i> und <i>C. albicans</i> sind möglich

Tabelle 8: Weitere kritische Einflussgrößen, die zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Allerdings wurde vorher weitestgehend sichergestellt, dass es sich um die Gattung Staphylokokken handelte, mit der Durchführung eines Katalasetestes. Außerdem wuchsen die Kolonien auf dem MRSA-ID Agar als rosa Kolonien vor der Überimpfung auf den COS-5 %-Agar.

Die weitere Bestätigung erfolgte mittels VITEK2 (Fa. Biomérieux, Marcy, Frankreich, VITEK2), MALDI-TOF (Fa. Bruker Daltonik GmbH, Microflex MALDI-TOF Massenspektrometer, Leipzig) und Microarray (Fa. Alere, Köln, Deutschland). Zusätzlich wurden, aus Kostengründen, nur die MRSA der Krankenhauspatienten durch PCR bestätigt.

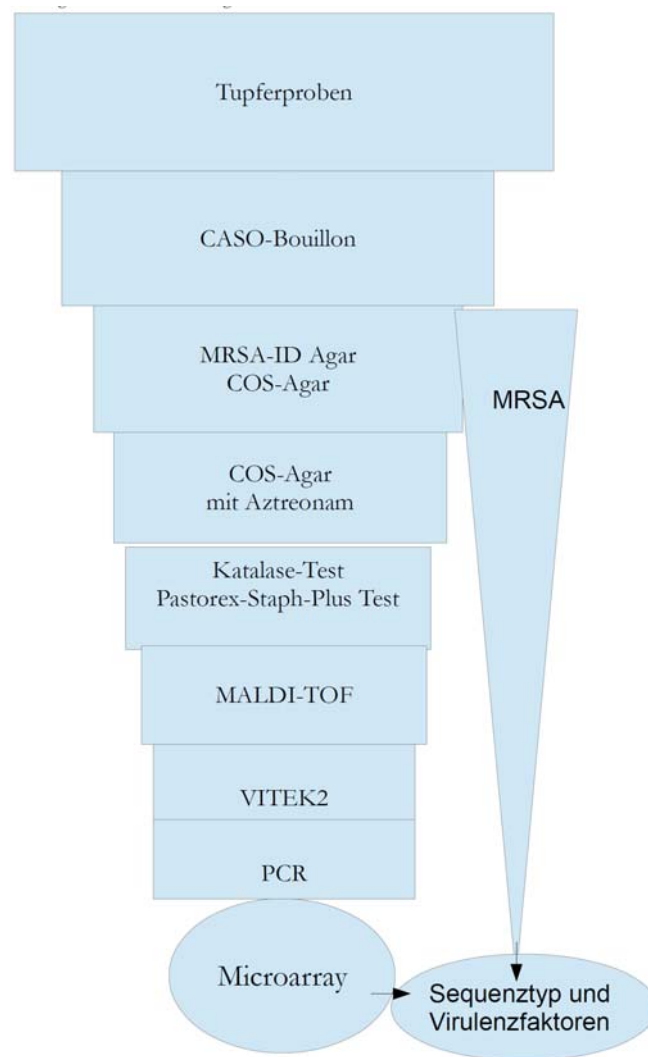


Abbildung 18: Anzucht, bakteriologische Untersuchung und molekularbiologische Differenzierung.

3.7 Konservierung der MRSA

Die MRSA-Reinkultur auf COS-5 %-Agar mit Aztreonam wurde mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers (Fa. Heinz-Herenz, Hamburg, Deutschland, Wattestäbchen) von der Platte abgenommen und in einem sterilen Skim-Milk Röhrchen (Skim Milk, Uniklinik Heidelberg, Deutschland) ausgedrückt. Die Skim-Milk Röhrchen konnten dann gekennzeichnet und bei minus 20 °C eingefroren werden.



Abbildung 19: Skim-Milk Röhrchen zur Konservierung der MRSA.

3.8 Molekularbiologische Differenzierung

3.8.1 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spectrometry)

Die *S. aureus* Isolate wurden zur Speziesbestimmung mit Sicherstellung, dass es sich um *S. aureus* handelte mittels MALDI-TOF (Fa. Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland, Microflex MALDI-TOF Massenspektrometer) untersucht. Die eingefrorenen humanen und porcinen MRSA-Isolate mussten zunächst wieder aufgetaut und zur Untersuchung der Kolonien mittels MALDI-TOF auf COS-5 %-Agar angezüchtet werden. Dabei sollten die Kulturen ein ideales Alter von 18-24 h haben und nicht älter als 48h sein. Zur Untersuchung wurden gut abgrenzbare Kolonien der Reinkulturen verwendet.

Die Untersuchungsmethode des MALDI-TOF beruht auf der Identifizierung der Erreger mittels charakteristischer Proteinspektren. Somit können *S. aureus* anhand ihres Proteinspektrums eindeutig charakterisiert werden.

3.8.1.1 Beladung des Metalltargets

Von den zuvor angezüchteten *S. aureus*-Isolaten wurde eine Kolonie mit einer Einwegöse (Fa. Looplast, Mailand, 5 µl Ösen) abgenommen, auf dem Metalltarget (Fa. Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland, MALDI-TOF Metalltarget) ausgestrichen und mit einer speziellen Matrix fixiert.

Pro Target-spot konnte mittels Direktausstrich eine gut sichtbare Menge Bakterien aufgetragen werden, die bei *S. aureus* etwa einer Kolonie entsprach. Es wurde pro Target-spot ein Mikroliter Matrix mit einer Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland, 10 µl Laborpipette) auf jeden beimpften „Target-spot“ aufgetragen und mit der Bakterienkolonie auf dem entsprechenden „Target-spot“ verrieben.

Dabei mussten die Begrenzungen des „Target-spot“ eingehalten und für jeden Spot eine neue Pipettenspitze (Fa. Starlab, Hamburg, Deutschland, TipOne 10 µl Graduated Filter Tip) verwendet werden.

Die Matrix bestand aus 20 mg alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland), 500 µl Acetonitril (100 %) (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 50 % und 500 µl Tri-fluor Essigsäure (5 %-ig) (Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 2,5 %. Die Matrix wurde nach dem Ansetzen geschüttelt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. In der fertigen Matrix sollte ein gelber Niederschlag erkennbar sein. Die Matrix musste immer dunkel gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht werden.

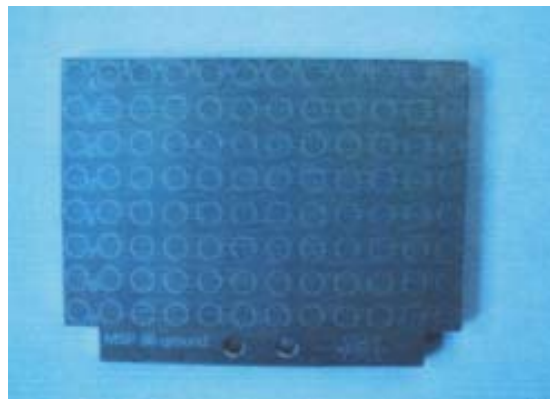


Abbildung 20: Metalltarget des MALDI-TOF.

Nachdem auf die aufgetragenen Bakterienkolonien die zuvor geschüttelte (Fa. Kurt Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland) Matrix pipettiert wurde, musste das Target trocknen.

3.8.1.2 MALDI-TOF Programmierung

Insgesamt erhielt jeder Durchgang zur Identifizierung von *S. aureus* einen eigenen Namen, z.B. Vet120814 (Bezeichnung/Jahr/Monat/Tag der Untersuchung) und jedes Isolat eine

Positionsnummer auf dem Target (Analyte Position, z.B. E1, E2, s. Abbildung: 21) zur Identifikation jeder Probe.

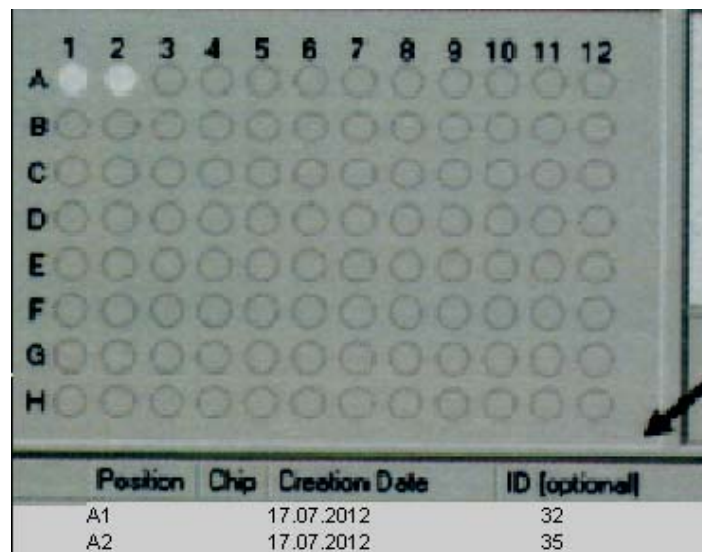


Abbildung 21: Benennung jedes MALDI-TOF Durchlaufes und Zuordnung jedes Isolates zu dem beimpften Target Spot.

3.8.1.3 MALDI-TOF Analyse

Das beimpfte Target musste zunächst trocknen und dann in das Hochvakuum des MALDI-TOF eingebracht werden, um die Bakterien mittels Laserstrahlen zertrümmern zu können. Die Fragmentgrößen betrugen 2000-20000 Dalton/ Ladung. Die entstandenen geladenen „Proteintrümmer“ wurden in einem elektrischen Feld beschleunigt mit Registrierung der Flugzeit und –strecke der „Proteintrümmer“. Aus der Anzahl, der Größe und der Ladung der „Proteintrümmer“ konnte dann ein spezifisches Spektrum erstellt werden. Dieses Spektrum wurde dann mit der Datenbank des MALDI-TOF verglichen und analysiert ob das Spektrum gleich einem in der Datenbank registrierten Organismus war. Diese Methode diente der Sicherstellung, dass es sich bei den Isolaten wirklich um *S. aureus* handelte. Nach Abschluss der Messung erschien die Liste mit den Ergebnissen, geordnet nach Target-spots.



Analyte Position	Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E1	(++)	 182	Staphylococcus aureus	2.157	Staphylococcus aureus	2.07
E2	(++)	 183	Staphylococcus aureus	2.261	Staphylococcus aureus	2.251

Abbildung 22: Ergebnisse des MALDI-TOF.

Die Ergebnisse wurden auch nach ihrer Sicherheit der Identifizierung (ID) der Ergebnisse in vier Kategorien eingeteilt (Score value):

- Die Grüne Ergebnisse bedeuteten hohe ID, mit einem Ergebnis über 2,0, sodass Genus und Spezies sicher erkannt wurden.
- Die Gelbe Ergebnisse zeigten zwar eine Übereinstimmung mit den bekannten Proteinspektren des Gerätes an, aber keine gute ID. Die Werte lagen zwischen 1,700 und 1,999.
- Rote Ergebnisse mit Werten unter 1,699 wurden nochmals wiederholt, sodass ein besseres Ergebnis erzielt und alle Isolate sicher *S. aureus* zugeordnet werden konnten (Standartarbeitsanweisung: Bode, Burckhardt et Heeg, 2008).

3.8.2 VITEK2

3.8.2.1 Beschreibung des VITEK2

Der Vitek2 (Fa. Biomérieux GmbH, Marcy, Frankreich, VITEK2®) wurde zur automatischen Identifizierung, mit erneuter Speziesbestätigung, der *S. aureus* Kolonien, folgend auf die Versuche des MALDI-TOF, verwendet. Er diente der qualitativen Resistenzbestimmung gegenüber Oxacilin, zur Bestätigung des Vorliegens der Oxacillin-/Methicillinresistenz.

Eine vorliegende Oxacillinresistenz weist auf eine bestehende Methicillinresistenz hin und bestätigt somit die Diagnose von Methicillin-resistenten *S. aureus* (Scheyer, 2007).

Das VITEK® 2 System verwendet zur Keimidentifizierung eine Methode, die auf den speziellen Merkmalen der Keime und dem Wissen über ihre biochemischen Reaktionen beruht. Von bekannten Stämmen wurde zuvor eine Datensammlung angelegt, die die typischen Reaktionen

der betreffenden Spezies enthält. Kann ein Identifizierungsmuster keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden, wird entweder eine Liste mit möglichen Keimen erstellt oder die Anmerkung erfolgt, dass der Stamm mit der vorhandenen Datenbank nicht identifizierbar ist.

Für die Messung stehen ganz allgemein zwei verschiedene optische Systeme zur Verfügung. Die Fluoreszenzoptik misst das Wachstum und die Aktivität der Keime indirekt anhand von chemischen Nebenprodukten. Der fluoreszierende Farbstoff absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm und strahlt das Licht sofort wieder mit einer Wellenlänge von 445 nm ab.

Das vom Fluoreszenzfarbstoff abgestrahlte Licht wird dann mit einem Detektor gemessen und ist direkt proportional zum Wachstum und zur Aktivität der Keime. Die Fluoreszenzoptik ist ein sich selbst kontrollierendes System und arbeitet mit einer internen Referenz.

Die Transmissionsoptik misst das Keimwachstum direkt anhand von sichtbarem Licht. Dieses Optiksystem misst zuerst das Licht, das durch eine Kavität dringt, bevor ein signifikantes Wachstum eingesetzt hat. Dann wird alle 15 min das Wachstum der Organismen gemessen. Dies geschieht durch die Messung der, aufgrund der mit steigender Trübung, abnehmenden Lichtmenge. Das Optiksystem arbeitet mit LEDs, die Licht einer bestimmten Wellenlänge erzeugen und mit Silizium-Photozellendetektoren, die das Licht einfangen. Die Daten werden dann mit der Datensammlung des Vitek2 verglichen und die Spezies zugeordnet sowie das Antibiotogramm erstellt (bioMérieux, VITEK2, 2010).

Alle MRSA-Isolate wurden auch, im Uniklinikum Heidelberg in der Arbeitsgruppe Frank, auf ihre Antibiotikaresistenzen gegenüber Oxacillin, Benzylpenicillin, Cefuroxim, Tetracyclin, Clindamycin, Clarythromycin, Erythromycin, Trimethoprim, Gentamicin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Fosfomycin, Fusidinsäure, Tigecyclin, Vancomycin und Mupirocin getestet. Mit den ST398-Isolaten aus dem Ausland von Schweinen wurden auch deren Resistenzen übermittelt, die mittels Vitek-2 nachgetestet wurden und somit auch mit den Ergebnissen der Resistenzen der MRSA-Isolate, der deutschen verglichen werden konnten.

3.8.2.2 Aufarbeitung der MRSA-Isolate

Die zuvor als Reinkulturen eingefrorenen MRSA-Isolate wurden mit Dreißenausstrich auf COS-5 %-Agarplatten ausgestrichen und bei 37° C +/- 1° C 24 h bebrütet. Dann erfolgte mittels aseptischer Technik die Umfüllung von 3,0 ml steriler Kochsalzlösung (0,45 % bis 0,50 % NaCl, pH 4,5 bis 7,0) in ein transparentes Röhrchen (12 mm x 75 mm) aus Kunststoff (Fa. Biomérieux GmbH, Marcy, Frankreich, VITEK2® Polystyrol). Mit einer Einmalöse (Fa. Greiner bio-one,

Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10 µl) wurde eine ausreichende Anzahl an Kolonien (meist 2–5 Kolonien), in das Röhrchen mit Kochsalzlösung gegeben. Unter Verwendung des kalibrierten VITEK® 2 DensiCHEK™ Plus Systems (Fa. Biomérieux, Marcy, Frankreich) konnte eine homogene Keimsuspension mit einer Dichte, die dem McFarland-Standard Nr. 0,50 bis Nr. 0,63 entspricht, hergestellt werden. Das Röhrchen wurde dann in den Carrier eingestellt und eine Resistenzkarte für grampositive Keime eingesetzt (Fa. Biomérieux, GmbH, Marcy, Frankreich, VITEK2® gram positive Resistenzkarte). Nach Beladung mit bis zu 12 Röhrchen erfolgte die Einsetzung des Carriers in den VITEK2. Die Ergebnisse wurden vom Gerät ausgedruckt und auch in elektronischer Form gespeichert. Zuvor musste dafür jedem Isolat ein Barcode zugeordnet werden, sodass jede Isolatnummer wiederzufinden war (Biomérieux, Vitek 2010).

3.8.2.3 Interpretation und Auswertung der Ergebnisse des VITEK2

Als wichtige Ergebnisse des VITEK2 in Bezug auf die spätere Identifizierung der Virulenzfaktoren und Genotypisierung im Microarray (Alere, Köln, Deutschland) wurde im Rahmen meiner Dissertation die Keimidentifizierung als *S. aureus* und die Oxacillinresistenz berücksichtigt. Die Oxacillinresistenz lässt auf die Methicillinresistenz schließen und so wurde das qualitative Ergebnis des Oxacillin-Tests mit S als sensibel und R als resistent gewertet.

Das Cefoxitin Testergebnis musste auch beachtet werden, da es eingesetzt werden kann, um eine *mecA*-vermittelte Oxacillin-Resistenz vorherzusagen. Der Cefoxitin-Test und die Oxacillin-MHK in Kombination ergeben das Endergebnis für die Oxacillinresistenz.

Labornummer	Material	Eingangsdatum	Abnahmedatum	Kultur	PCR
SR201639 (K1)	Abstrich 229 Screening auf resistente gram-negative Stäbchen	07.08.2012	07.08.2012	Staphylococcus aureus	

Antibiogramm	K1				
Oxacillin	R				
Cefoxitin-Screen	+				

Abbildung 23: Ergebnisse des Vitek2.

3.8.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)

3.8.3.1 Beschreibung der PCR-Methode zum Nachweis des *mecA*-, *femB*- und *nuc*-Gens der MRSA der Krankenhauspatienten

Die PCR dient als Goldstandard der genotypischen Identifizierung des *mecA*-Gens der MRSA (Unal et al. 1992, Vannuffel et al. 1995, Maes et al. 2002, Poulsen et al. 2003, Huletsky et al. 2004). Mit Hilfe der Real-Time Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden, die für *S. aureus* spezifischen subgenischen Abschnitte der Gene *mecA*, *femB* und *nuc*, des Bakteriengenoms in einem Multiplex-Ansatz amplifiziert und durch jeweils eine spezifische, fluoreszenzmarkierte Sonde detektiert. Normalerweise werden hierbei nur *mecA*- und *femB*-Gen bestimmt. Ein als Alternative zu wählender Genomabschnitt für *femB* ist *nuc*.

Gen-Abschnitt aus	Fluoreszenzmarkierung der Sonde		Detektionskanal Smartcycler
	5'-Markierung (Reporter)	3'-Markierung (Quencher)	
<i>mecA</i> (Methicillin-Resistenz)	FAM	BHQ-1	Kanal 1
<i>femB</i>	TET	BHQ-1	Kanal 2
<i>nuc</i> (Thermonuclease) ²	TET	BHQ-1	Kanal 2

Abbildung 24: Die Genabschnitte *mecA*, *femB* und *nuc*.

Aus Kostengründen konnten nur die MRSA der Krankenhauspatienten mittels PCR untersucht werden, da sie gemäß der Vorschriften des MRSA-Diagnostiklabors eine PCR durchlaufen müssen. Die PCR diente als eine weitere Möglichkeit der Speziesbestimmung von *S. aureus* und Sicherung des Vorliegens von MRSA.

Die Grundlage der qPCR beruht auf dem Förster- oder Fluoreszenz- Resonanz- Energie-Transfer (FRET). Dabei beruht das Prinzip darauf, dass sich ein Fluoreszenzfarbstoff („reporter“) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge λ_1 anregen lässt und dann die aufgenommene Energie als Licht der Wellenlänge λ_2 abstrahlt. Ein zweiter Farbstoff („quencher“) dessen Anregungswellenlänge λ_3 ist kann dabei angeregt werden und wieder Energie als Licht mit der Wellenlänge λ_4 abgeben. Der Farbstoff 1 gilt als sogenannter „reporter“ der Farbstoff 2 als „quencher“.

Die Grundlage der real-Time PCR beruht auf der Zugabe einer mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten, spezifischen Sonde (Taq-Man-Sonde). Diese bindet zwischen den beiden verwendeten Primern. Dabei sitzen der „Reporter“ und der „Quencher“ auf demselben Oligonukleotid am 5'- bzw. 3'-Ende.

Solange die Sonde intakt ist, ist die Lichtstärke bei E1 gering. Durch die Exonuklease-Aktivität wird die Sonde bei der Elongation abgebaut. Die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe geht verloren und die Lichtstärke E1 beginnt anzusteigen. Je mehr DNA gebildet wird, desto mehr Reporter-Moleküle werden frei und somit steigt die Signalstärke an. Die Lichtstärke wird am Ende eines jeden Elongationsschrittes gemessen.

Bei der durchgeführten *mecA*-, *femB*-PCR wurde durch die 5'-Nuclease-Aktivität der Taq-Polymerase während des Reaktionsverlaufes, die Sonde zerstört, sodass der Reporterfarbstoff räumlich vom Quencher-Molekül getrennt werden konnte. Dadurch wurde die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes detektiert und vom Smartcycler (Fa. Cepheid, Maurens-Scopont, Frankreich) als Amplifikationskurve aufgezeichnet (Dalpke, Hofko 2008).

3.8.3.2 Nukleinsäureisolation aus den *S. aureus* Isolaten

Zur schnellen DNA-Extraktion aus *S. aureus*-Isolaten wurden die zuvor eingefrorenen Isolate mit Dreißenausstrich auf COS-5 %-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C +/- 1 °C 24 h bebrütet. Jeweils 1-2 Kolonien mussten dann in DNA-Aufreinigungspuffer (Uniklinik Heidelberg, Deutschland) in 1,5 µl Eppendortubes (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und gevortext werden (Fa. Kurt Migge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland). Die Eppendorfgefäße mit den Kolonien wurden dann 10 min bei 95° C im Heizblock (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Thermomixer comfort) erhitzt und dann 10 min geschüttelt. Danach fand 5 min lang eine Zentrifugation bei 13000 UpM statt (Fa. Heraeus-Kendro, Hanau, Deutschland, Biofuge pico) und der Überstand konnte direkt als Probe in die PCR eingesetzt werden (Dalpke et Hofko 2008).

3.8.3.3 Herstellung des Mastermixes

Zunächst mussten alle Primer (Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) mit 0,01 µmol bzw. 0,1 µmol in die Gebrauskonzentration (s. Tabelle 25) gelöst werden.

	Sequenz (5' → 3')	Gebrauchs- lösung
mecA-Gen (mecA):		
mecA1	GAT AAA AAA GAA CCT CTG CT	50pmol/μl
mecA2	ACT GCC TAA TTC GAG TG	50pmol/μl
mecA-Sonde	FAM-ACA ACT TCA CCA GGT TCA ACT CAA A-BHQ1	10pmol/μl
femB-Gen:		
femB fw	AAT TAA CGA AAT GGG CAG AAA CA	5 pmol/μl
femB rv	TGC GCA ACA CCC TGA ACT T	5 pmol/μl
femB-Sonde	TET-AGA AAT TAA CTG GAT GGT ACG CGC GAA GA	10 pmol/μl
Thermonuklease (nuc)		
nuc fw	GAT TGA TGG TGA TAC GGT	5 pmol/μl
nuc rv	CAA GCC TTG ACG AAC TA	5 pmol/μl
nuc-Sonde	TET-CAA TGA CAT TCA GAC TAT TAT TGG TTG A-BHQ1	10pmol/μl

Abbildung 25: Primer.

Zur Herstellung des Mastermixes (Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) wurden *mecA1* und *mecA2* auf je 50 pmol/μl sowie *femBfw* und *femBrv* auf jeweils 5 pmol/μl gelöst. Die Lösungen jedes Primers wurden zu gleichen Teilen mit 0,25 μl/Ansatz in ein 200 μl Eppendorftube (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert zur Herstellung des Primermixes. Die Sonde *mecA* und *femB* musste dann auf 10 pmol/μl gelöst und dann jeweils mit 0,37 μl/Ansatz Mastermix verwendet werden. Dann wurden noch 12,5 μl 2Xtaq-Puffer und 2,5 μl Wasser (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland, aqua ad injectabilia) hinzugefügt um 22,5 μl Mastermix zu erhalten (Geiss et Frey 2005).

3.8.3.4 Extraktions- und Amplifikationskontrolle

Steriles DNA- und RNA-freies Wasser (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland, aqua ad injectabilia) wurde anstelle von DNA in entsprechender Menge verwendet und als Negativkontrolle in die PCR eingesetzt.

3.8.3.5 Durchführung der PCR

Für jede zu untersuchende Probe wurden 22,5 µl des Mastermixes in ein Smartcycler-Reaktionsgefäß (Fa. Cepheid, Maurens-Scopont, Frankreich) pipettiert, 2,5 µl des Lysatüberstandes der Probe hinzugegeben und das Gefäß verschlossen und beschriftet. Das Reaktionsgefäß musste kurz mit der Smartcycler-Zentrifuge (Fa. Cepheid, Maurens-Scopont, Frankreich) anzentrifugiert werden, sodass sich danach keine Luftblasen mehr im Reaktionsraum befanden. Das Röhrchen wurde dann in den Smartcycler gegeben und das Programm *mecA* gestartet.

Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 2,5 µl MRSA-Lysat und als Negativkontrolle ein Ansatz mit 2,5 µl MSSA-Lysat (Geiss et Frey 2005).

3.8.3.6 Bewertung der Ergebnisse

Zur Auswertung wurden die Amplifikationskurven des *mecA*- (FAM-Kanal) sowie des *femB*-Gens (TET-Kanal), von der Aufzeichnung des SmartCyclers herangezogen. Die Probe war als positiv zu werten, wenn die Amplifikationskurve den Grenzwert von dreißig überstieg und eine typische Form aufwies. Eine Probe war als negativ zu werten, wenn sie annähernd eine Gerade bildet und so den Grenzwert nicht überstieg.

Die Positivkontrolle muss dabei *mecA*- und *femB*-positiv ausfallen, die Negativkontrolle *mecA* und *femB*-negativ sein. Falls eine Probe nur *femB*-negativ war handelte es sich nicht um *S. aureus* oder die Probe war anderweitig gehemmt. In diesem Fall galt die PCR als nicht auswertbar und musste wiederholt werden (Klotz et al. 2003, Costa et al. 2005, Geiss et Frey 2005).

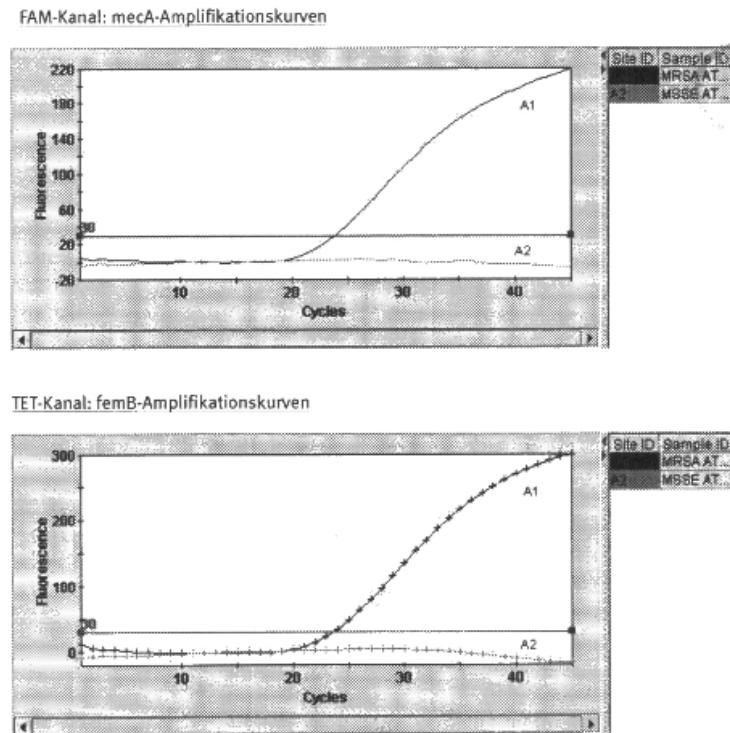


Abbildung 26: Amplifikationskurven des *mecA*- (FAM-Kanal) und des *femB*-Gens (TET-Kanal).

3.8.4 Microarray

Der Microarray (Fa. Alere GmbH, Köln, Deutschland) diene der Genotypisierung der MRSA mit Vergleich der Virulenzfaktoren zwischen MRSA der Krankenhauspatienten und porcinen MRSA. Diese Untersuchung war der Schwerpunkt der Dissertation. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde er zur Bestimmung der Stammzugehörigkeit mit SCC-mec-Typisierung, der *agr*-Gruppen, der Exotoxine, der MSCRAMMs, der *set-/ssl*-Gene und v.a. der Virulenzfaktoren verwendet.

Er misst insgesamt 330 klinisch relevante Marker zur Erkennung und weiteren Differenzierung, von *S. aureus*.

Zunächst musste eine DNA-Extraktion erfolgen. In einer PCR ähnlichen Amplifikation mit der Markierung von Zielgenen wurden die Reaktionsprodukte intern durch den Einbau von 16-Biotin-dUTP markiert. Die dadurch markierten einzelsträngigen DNA-Moleküle konnten dann gegen eine Vielzahl auf dem DNA-Microarray enthaltene kovalent immobilisierter, spezifischer DNA-Sonden hybridisiert werden. Die Sonden wurden in einer Matrixanordnung aufgebraucht, wobei die Lage der Sonden auf dem Array bekannt war. Die DNA-Sonden dienen so der Genotypisierung. Nach der Durchführung der Hybridisierung und einer Farbreaktion zur

Visualisierung erhielt man das Ergebnis, welche Gene das MRSA-Isolat enthielt und welche nicht (Monecke et al. 2008).

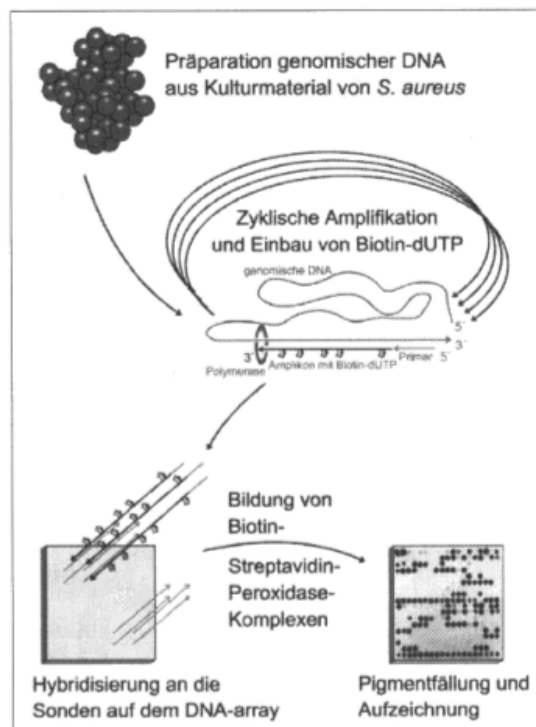


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Microarray Analyse (nach Monecke et al. 2008).

3.8.4.1 DNA Extraktion

Die zuvor durch einfrieren konservierten MRSA-Isolate wurden 24h vor Beginn der DNA-Extraktion auf einem COS-5 %-Agar ausgestrichen (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, Inoculation Loop, 10 µl) und bei 37 °C +/-1 Grad bebrütet.

Zur Durchführung der *S. aureus*-Genotypisierung, mit dem Microarray wurde 0.5-2 µg intakte DNA eines einzigen Klons benötigt. Die extrahierte DNA durfte keine RNA Rückstände mehr aufweisen.

Zunächst wurden 0,2 ml des Alere Lysis Puffer A1 (Fa. Alere GmbH, Köln, Deutschland), der Lysostaphin, Lysozym und Tris-EDTA enthielt zum DNA-Aufschluss, in das Alere Tube mit dem Lysis Enhancer A2 (Fa. Alere GmbH, Köln, Deutschland) pipettiert. Dieses Tube enthielt ein Pellet zur Zellwandlyse von *S. aureus*, sowie RNase.

In das mit A1 Puffer gefüllte Tube wurde eine komplett gefüllte Einmalöse (Fa. Looplast, Mailand, Italien, 5 µl Ösen) mit *S. aureus*-Kolonien gegeben. Dabei musste fast dreiviertel der beimpften COS-5 %-Agarplatte verwendet werden. Das Tube wurde dann für 60 min bei 37 °C und 550 rpm in einem Thermoshaker (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Thermomixer comfort) inkubiert und geschüttelt.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit einem Qiagen Blood Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit 250).

Nach der Inkubation wurden 25µl Proteinase K (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Qiagen ProteinaseK) zu den inkubierten Bakterien gegeben und dann 200µl des AL-Lysispuffers (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Qiagen AL-Lysispuffer) hinzugegeben. Das Tube musste gevortext und dann 60 min bei 56 °C und 550 rpm inkubiert werden. Dann erfolgte ein Spin-Down (Fa. Heraeus-Kendro, Hanau, Deutschland, Biofuge pico) und das Hinzugeben von 200 µl absoluten Ethanol (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland, Ethanol).

Danach wurden die Proben wieder 5-10 sec vorgetextet und es erfolgte ein Spin-Down mit 8000 U/min für 10sec. Das ganze Volumen wurde mit einer Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Pipette 100-1000 µl) in ein Spintube (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Spintube) überführt. Dabei war darauf zu achten, dass der Rand nicht benetzt wurde. Eine Zentrifugation des Spintubes bei 8000 U/min für eine Minute folgte. Dann wurde das Spintube auf ein frisches Collectiontube (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Collectiontube) gesetzt und dabei darauf geachtet, den unteren Rand nicht zu berühren. Zu jeder Probe mussten 500 µl AW-1 Waschpuffer (Fa. Qiagen, Hilden, Qiagen AW-1 Puffer) dazugegeben werden und eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 8000 U/min erfolgte.

Das Spintube wurde wieder auf ein neues frisches Collectiontube gesetzt und 500 µl AW-2 Waschpuffer (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Qiagen AW-2 Puffer) dazugegeben. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation der Probe bei 13000 U/min für drei Minuten und das Spintube wurde auf ein beschriftetes (entsprechend des eingefrorenen Isolates) 1,5 ml Eppendorftube (Fa. Eppendorf, Hamburg) gesetzt und mit 200 µl AE-Puffer (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland, Qiagen AE-Puffer) eluiert. Die Probe wurde danach eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und mit 8000 U/min für eine Minute zentrifugiert. In dem Eppendorftube war nach der Entfernung des Spintubes die DNA enthalten.

3.8.4.2 Lineare Amplifikation mit Biotin-Markierung

Zur linearen Amplifikation wurden 0,5 bis 1,5 µg clonaler und intakter *S. aureus*-DNA verwendet. Zunächst mussten 5 µl ultrapures Wasser (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland, aqua ad injectabilia) in jedes PCR Tube (Fa. Sarstel, Nümbrecht, Deutschland, Multiply pro Gefäß 0,5 ml) gegeben werden. Der Mastermix, als Mischung von jeweils einem Primer pro Target, einer Polymerase dNTPs und Biotin-markiertem dUDP entstand durch Kombination von 4,9 µl B1 Puffer (Fa. Alere GmbH, Köln, Deutschland, Labelling Puffer) und 0,1 µl B2 Puffer (Fa. Alere, Köln, Deutschland, DNA-Polymerase). In jedes PCR Tube wurden dann noch 5 µl des Mastermixes und 11 µl DNA pipettiert.

Dann musste ein Thermocycler Protokoll durchgeführt werden indem zuerst der Deckel des Primus-Thermocyclers (Fa. Hain Lifescience GmbH, Nehren, Deutschland, Primus25) auf 105 °C erhitzt wurde.

Es erfolgte zunächst ein Durchgang von 300 sec und 96 °C. Dann folgten jeweils 45 Cyclen mit 20 sec und 50 °C, 30 sec und 72 °C sowie 20 sec und 96 °C. Am Ende wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

3.8.4.3 Genotypisierung

3.8.4.3.1 Hybridisation

Zur Durchführung der Hybridisation musste der Thermoshaker (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Thermomixer comfort) zunächst auf 55 °C vorgeheizt werden. Dann erfolgte die Gabe von 200 µl Wasser (Fa. Braun, Melsungen, aqua ad injectabilia) in jedes Microarray-Reaktionsgefäß, (Fa. Alere, Köln, Deutschland Stripes) welches mit der Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg mit Pipettenspitzen der Fa. Starlab, Hamburg, Deutschland, TipOne Graduated Filter Tip) viermal wieder aufgenommen, durchmischt und dann wieder entfernt wurde. Dabei war immer darauf zu achten die Array-Oberfläche nicht mit der Pipettenspitze zu berühren, da ansonsten der Array nicht mehr abgelesen werden konnte. Der Array bestand aus einer ca. 3x3mm großen und chemisch veränderten Spezialglasscheibe, die am Boden der 1,5 ml Standard-Microarray-Reaktionsgefäße lag.

Danach wurden 200 µl C1 Puffer in jedes Reaktionsgefäß gegeben, abgedeckt und für 2 min bei 55 °C und 550 rpm im Thermoshaker inkubiert. Dann wurde der Inhalt entfernt und jeweils 10 µl DNA und 90 µl C1 Puffer (Fa. Alere, Köln, Deutschland, C1-Puffer) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Zuvor war die Position jedes MRSA-Isolates in einer Excel-Tabelle einem

Reaktionsgefäß zugeordnet worden. Die Reaktionsgefäße mussten verdeckt und bei 55 °C und 550 rpm für eine Stunde inkubiert werden.

3.8.4.3.2 Erster Wasch-Schritt

Nach der Inkubation wurde der Inhalt aus den Reaktionsgefäßen heraus pipettiert und die Reaktionsgefäße insgesamt dreimal mit 200 µl des Puffers C2 gespült, indem der Puffer viermal mit der Pipette auf und ab gezogen und dann entfernt wurde.

3.8.4.3.3 Straptavidin-Horseradish-Peroxidase Verdünnung

Zur Anfertigung der Straptavidin-Horseradish-Peroxidase (SHP) Verdünnung erfolgte eine Mischung der Puffer C3 (Fa. Alere, Köln, C3 Lösung/Straptavidin-Horseradish-Peroxidase) und C4 (Fa. Alere, Köln, Deutschland, C4-Puffer) im Verhältnis 1:100. Von dem C3/C4 Gemisch wurden in jedes Reaktionsgefäß 100 µl gegeben und bei 30 °C und 550 rpm für 10 min inkubiert. Der zuvor erfolgte Einbau der biotinylierten dUTP ermöglichte die Erkennung dieser markierten Amplifikationsprodukte an den im DNA-Array immobilisierten Sonden. Der SHP-Komplex band an das dUTP, das bei der Amplifikation in die Reaktionsprodukte der DNA eingebaut wurde und einen durch die Peroxidase katalysierten Niederschlag eines präzipitierenden Tetramethylbenzidin bildete (Monecke et al. 2008).

3.8.4.3.4 Zweiter Wasch-Schritt

Dann wurde das Konjugat in den Reaktionsgefäßen verworfen und zweimal mit 200 µl des Puffers C5 (Fa. Alere, Köln, Deutschland, C5-Puffer) gespült. Die Entfernung des Puffers C5 aus den Reaktionsgefäßen erfolgte vollständig, da sich vor der Durchführung des letzten Schrittes keine Flüssigkeiten mehr in den Reaktionsgefäßen befinden durfte.

3.8.4.3.5 Farbreaktion

Dann wurde 100 µl des Puffers D1 (Fa. Alere, Köln, Deutschland, D1-Puffer) in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur, verdeckt im Dunkeln, inkubiert.

3.8.4.3.6 Analyse

Der Array-Streifen musste sofort nach der Inkubation in den ArrayMateReader (Fa. Alere, Köln, Deutschland, Reader) zum Ablesen, eingelegt werden. Innerhalb von 10 min wurden von dem Reader alle für die Doktorarbeit relevanten Gene der MRSA identifiziert.

Der Reader misst die aktiven Flächen der Arrays und ordnet jeder Sonde einen Grauwert zu der einem internen Skript entspricht und damit verglichen wird. So wird das Vorhandensein oder die Abwesenheit der untersuchten Gene der MRSA vom Microarray identifiziert (Monecke et al. 2008).

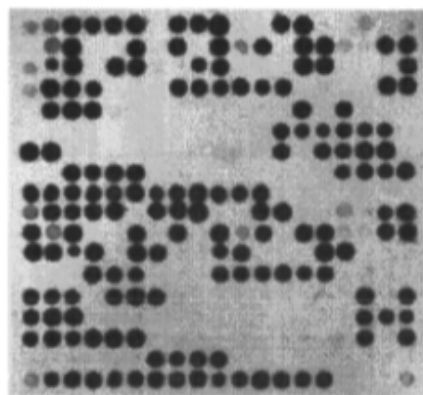


Abbildung 28: Aktive Flächen eines DNA-Arrays (nach Monecke et al. 2008).

TYPING SUMMARY

Result	
MLST clonal complex affiliation	CC398
strain	CC398-MRSA-V
strain synonyms	Dutch livestock-associated MRSA, "Dutch Pig strain"
assignment score for CC Identification	91.81%
MRSA (mecA)	positive
PVL	negative

REGULATORY GENES

Target Gene	Result	Description
agrI (total)	positive	accessory gene regulator allele I
agrII (total)	negative	accessory gene regulator allele II
agrIII (total)	negative	accessory gene regulator allele III
agrIV (total)	negative	accessory gene regulator allele IV

METHICILLIN RESISTANCE GENOTYPE AND SCCmec TYPING

Target Gene	Result	Description
mecA	positive	alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA

Abbildung 29: Microarray Protokoll (Ausschnitt).

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung fand mit SPSS für Windows Version 21.0 (Fa. IBM, Saarbrücken, Deutschland) statt. Dabei wurde der Chi-Quadrattest bei Auswertung von Vierfeldertafeln angewandt und das Signifikanzniveau berechnet. Des Weiteren wurde SPSS zur Berechnung des Mittelwertes, der Normalverteilung und der Standardabweichung verwendet und zur Erstellung der Tabellen und Grafiken in den Ergebnissen herangezogen.

4. Ergebnisse

Teil I: MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben

4.1 MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben

Die Schweinebetriebe in Hessen, Baden-Württemberg, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen wurden im Zeitraum von Juni bis November 2012 beprobt. Insgesamt konnten 27 verschiedene Betriebe untersucht werden. Der erste Betrieb diente als Screeningbetrieb und wurde einer wiederholten Untersuchung unterzogen, allerdings umfasste die Beprobung einmal den Abferkelstall sowie den Maststall und einmal nur den Wartestall. Das Hauptziel der Untersuchung war es genügend MRSA-Isolate zu erhalten, um sie auf ihre Virulenzfaktoren mittels Microarray zu untersuchen und mit den Isolaten der Krankenhauspatienten aus dem Universitätsklinikum Heidelberg zu vergleichen. So wurden in jedem Betrieb von mindestens 10 Schweinen Nasentupferproben entnommen, sowie Sammelstaubproben des beprobten Stalles und Sockentupfer, um Staub vom Boden zu sammeln und analysieren zu können. Außerdem wurden noch Tupfer von Tränken und Spielketten der Schweine, falls sie vorhanden und zu beproben waren entnommen, um Ergebnisse über das Vorkommen von MRSA bei Gegenständen mit direktem Schweinekontakt zu erhalten.

In Hessen konnten zwölf Betriebe untersucht werden, in Baden-Württemberg und Nordrheinwestfalen jeweils zwei Betriebe und in Niedersachsen elf Betriebe.

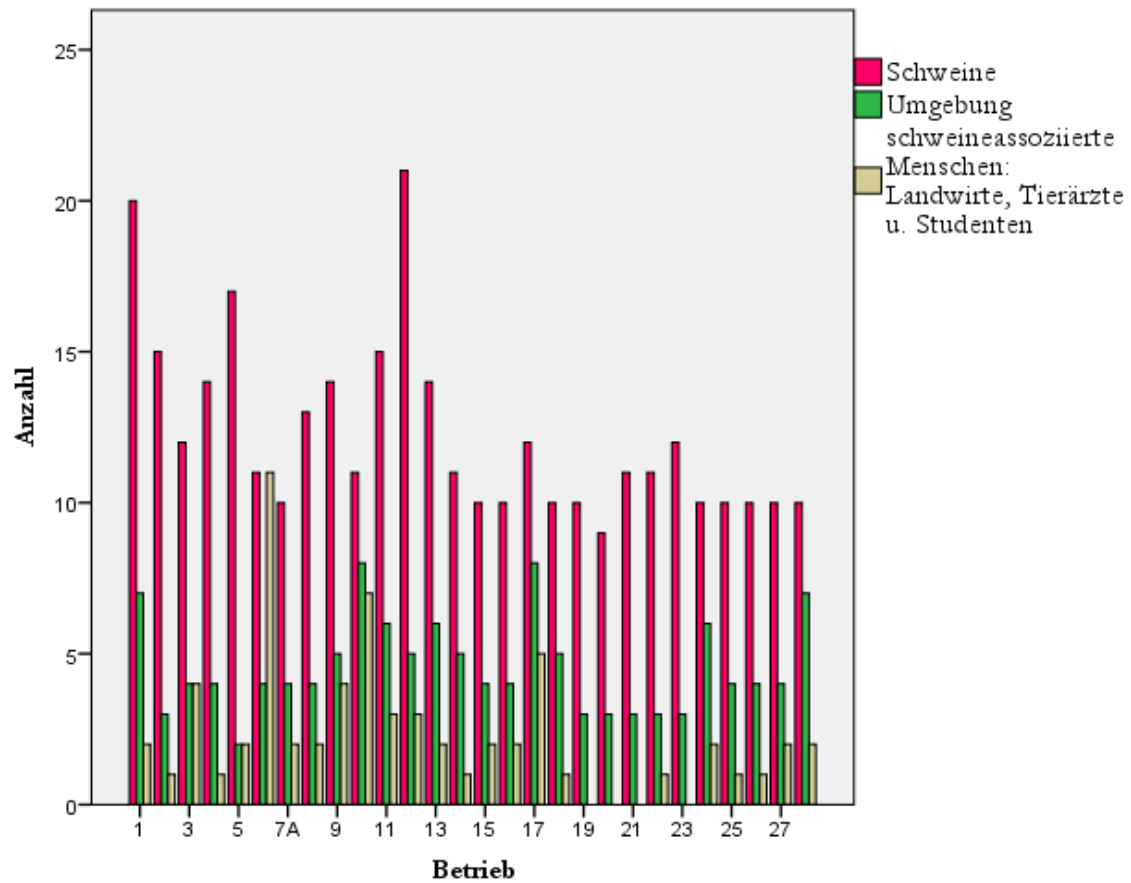


Abbildung 30: Entnommene Proben in den einzelnen Betrieben.

		Entnommene Proben			Gesamt
		Schwein	Umgebung	Schweine- assoziierte Menschen	
Betrieb	1	20	7	2	29
	2	15	3	1	19
	3	12	4	4	20
	4	14	4	1	19
	5	17	2	2	21
	6=1	11	4	11	26
	7A	10	4	2	16
	8=7B	13	4	2	19
	9	14	5	4	23
	10	11	8	7	26
	11	15	6	3	24
	12	21	5	3	29
	13	14	6	2	22
	14	11	5	1	17
	15	10	4	2	16
	16	10	4	2	16
	17	12	8	5	25
	18	10	5	1	16
	19	10	3	0	13
	20	9*	3	0	12
	21	11	3	0	14
	22	11	3	1	15
	23	12	3	0	15
	24	10	6	2	18
	25	10	4	1	15
	26	10	4	1	15
	27	10	4	2	16
	28	10	7	2	19
Gesamt		343	128	64	535

Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der entnommenen Proben in jedem untersuchten Betrieb (* in Betrieb 20 war ein entnommener Nasentupfer nicht mehr zu verwenden, daher nur 9 Isolate).

In Hessen konnten insgesamt 185 Schweine (53,9 %, n=185/343), 64 Umgebungsproben (50,0 %, n=64/128) und 47 schweineassoziierte Menschen (73,4 %, n=47/64) beprobt werden. Unter dem Begriff „schweineassoziierte Menschen“ werden alle Personen mit Schweinekontakt, wie

Landwirte, Tierärzte und Studenten der Veterinärmedizin zusammengefasst. In Niedersachsen wurden 113 Schweine (32,9 %), 45 Umgebungsproben (35,2 %) und 10 Menschen (15,6 %) beprobt. In Baden-Württemberg ließen sich 25 Schweine (7,3 %), 11 Umgebungsproben (8,6 %) und 3 Menschen (4,7 %) beproben und in NRW konnten 20 Nasentupfer von Schweinen (5,8 %), 8 Umgebungsproben (2,3 %) und 4 Nasentupfer von Menschen (6,3 %) entnommen werden.

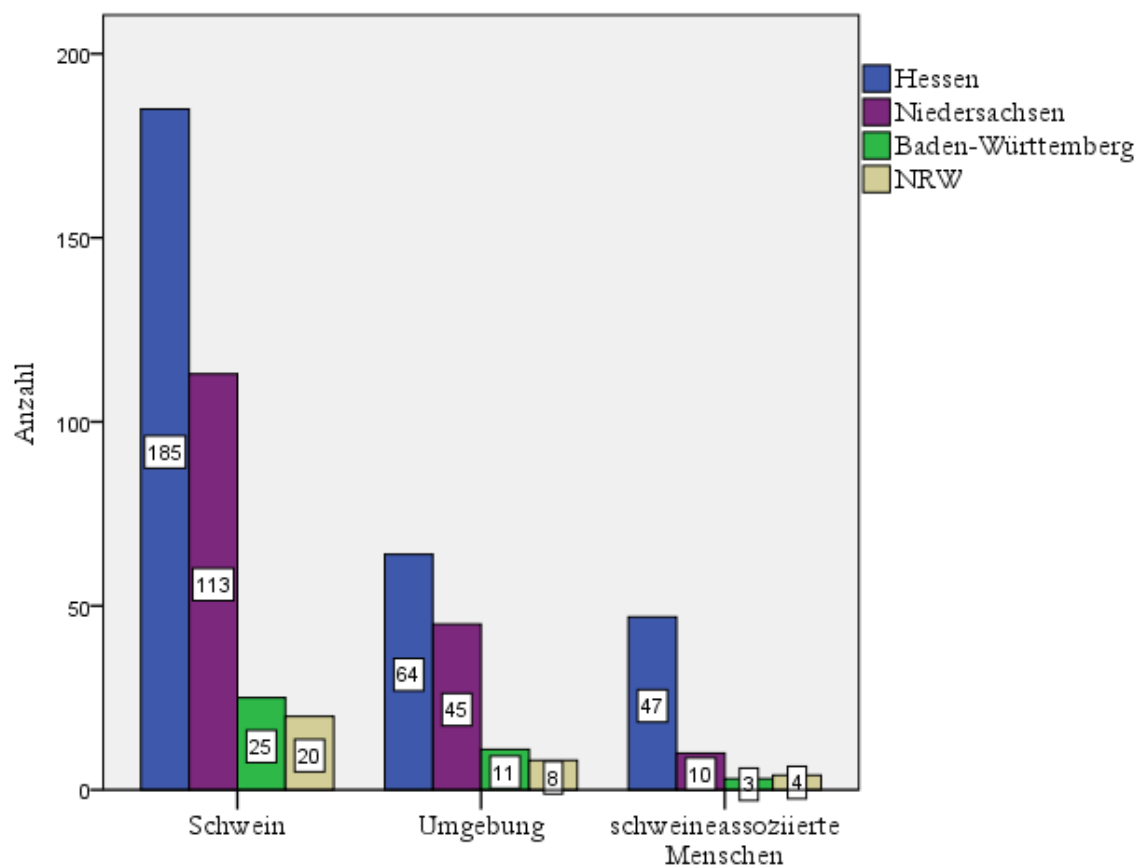


Abbildung 31: Anzahl der entnommenen Proben mit geographischer Verteilung.

4.1.1 Anzahl positiver Betriebe: Herdenprävalenz

Von den untersuchten 27 Betrieben wurden in 23 Betrieben (85,2 %, $n=23/27$) MRSA aus Nasentupferproben von Schweinen oder aus der Umgebung isoliert. Ein Betrieb galt als MRSA-positiv wenn mindestens ein Schwein oder eine Umgebungsprobe MRSA-positiv war. Von den untersuchten Betrieben wurde in 21 Betrieben (77,7 %) mindestens ein Schwein mit MRSA identifiziert und in zwei Betrieben (7,4 %) war zwar kein Schwein aber mindestens eine

Umgebungsprobe MRSA-positiv. In 74,1 % der Betriebe (n=20/27) waren sowohl der Staub als auch die Schweine MRSA-positiv.

	MRSA-positive Proben		Gesamt
	Schwein	Umgebung	
Betrieb 2	13	1	14
3	0	1	1
5	10	0	10
7A	5	3	8
7B	11	4	15
9	14	5	19
10	4	7	11
11	12	6	18
12	17	5	22
13	3	2	5
14	11	5	16
15	9	4	13
16	0	1	1
19	3	3	6
20	5	1	6
21	1	1	2
22	3	1	4
23	6	2	8
24	9	6	15
25	10	4	14
26	10	3	13
27	9	3	12
28	7	4	11
Gesamt	172	72	244

Tabelle 10: Anzahl der Nasentupferproben von Schweinen und Umgebungsproben mit MRSA pro Betrieb (Siehe auch Tabelle: 12).

Von den entnommenen 343 Nasentupfern von Schweinen waren 172 mit MRSA kolonisiert (50,1 %). Auch 72 der entnommenen 128 Umgebungsproben (56,3 %) und 35 der 64 Proben (54,7 %) von Landwirten, Tierärzten und Studenten waren MRSA-positiv.

Außerdem wurden in 16 der 27 Betrieben (59,3 %) MRSA bei den Landwirten des entsprechenden Betriebes isoliert und bei 22 Betrieben (81,5 %) konnten MRSA in den Umgebungsproben nachgewiesen werden.

		MRSA bei Landwirten		Gesamt
		positiv	negativ	
Betrieb	1	0	7	7
	2	1	0	1
	3	0	2	2
	4	0	1	1
	5	2	0	2
	7A	1	0	1
	7B	1	1	2
	10	3	0	3
	11	1	0	1
	12	2	0	2
	13	0	1	1
	14	1	0	1
	15	1	1	2
	16	0	2	2
	17	0	2	2
	18	1	0	1
	22	1	0	1
	24	2	0	2
	25	1	0	1
	26	1	0	1
	27	1	0	1
	28	2	0	2
Gesamt		22	17	39

Tabelle 11: Betriebe, in denen MRSA aus den Nasentupfern der untersuchten Landwirte isoliert werden konnten.

In einem der Betriebe mit positivem Befund beim Landwirt konnten weder bei den Schweinen noch in den Umgebungsproben MRSA nachgewiesen werden. Bei diesem Betrieb handelte es sich um den Betrieb Nr. 18 aus Niedersachsen.

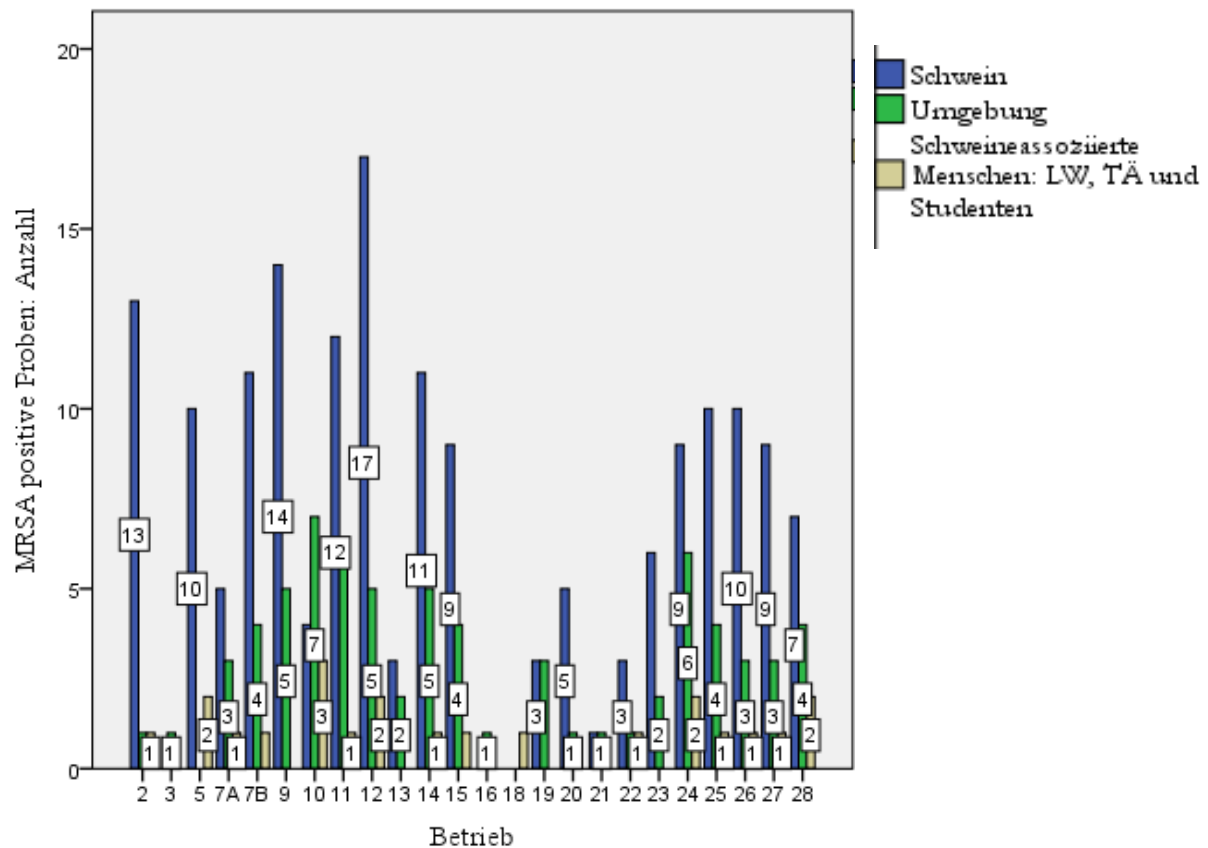


Abbildung 32: MRSA-positive Proben in den untersuchten Betrieben.

Von den 27 untersuchten Betrieben wurden in 14 Betrieben (51,9 %) MRSA sowohl bei den Schweinen, den Landwirten des Betriebes als auch in den Umgebungsproben nachgewiesen.

4.1.2 Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA

Von den 21 Schweinebeständen mit MRSA-kolonisierten Schweinen konnte eine Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA von durchschnittlich 67,3 % ermittelt werden. Dabei lag bei vier Betrieben eine sehr hohe Intraherdenprävalenz von über 95 % vor. Als niedrigprävalente Schweinebetriebe konnten lediglich die sechs der 27 Betriebe ohne MRSA-kolonisierten Schweine identifiziert werden.

Betriebsnummer	Bundesland	MRSA-positive Nasentupfer	Intraherdenprävalenz
2	Hessen	13/15	86,7 %
5	Hessen	10/17	58,8 %
7A	Hessen	5/10	50 %
7B	Hessen	11/13	84,6 %
9	Hessen	14/14	100 %
10	Hessen	4/11	36,4 %
11	Hessen	12/15	80 %
12	Hessen	17/21	81,0 %
13	Baden-Württemberg	3/14	21,43 %
14	Baden-Württemberg	11/11	100 %
15	NRW	9/10	90 %
19	Niedersachsen	3/10	30 %
20	Niedersachsen	5/9	55,6 %
21	Niedersachsen	1/11	9,1 %
22	Niedersachsen	3/11	27,3 %
23	Niedersachsen	6/12	50 %
24	Niedersachsen	9/10	90 %
25	Niedersachsen	10/10	100 %
26	Niedersachsen	10/10	100 %
27	Niedersachsen	9/10	90 %
28	Niedersachsen	7/10	70 %

Tabelle 12: Intraherdenprävalenz bei Schweinen der untersuchten Betriebe.

Verteilung der Intraherdenprävalenz	Anzahl an Betrieben
<5 %	6
5-24 %	2
25-49 %	3
50-74%	5
75-94%	7
95-100 %	4

Tabelle 13: Verteilung der Intraherdenprävalenzen von niedrig- zu hochprävalent.

4.1.3 MRSA-Prävalenz bei Ferkeln, Absetzern, Sauen und Mastschweinen unterschiedlicher Altersklassen

Von den 343 entnommenen Nasentupferproben von Schweinen stammten 112 von Absetzern, 126 von Ferkeln, 52 von Mastschweinen, 51 von Sauen und 2 von Deckebern.

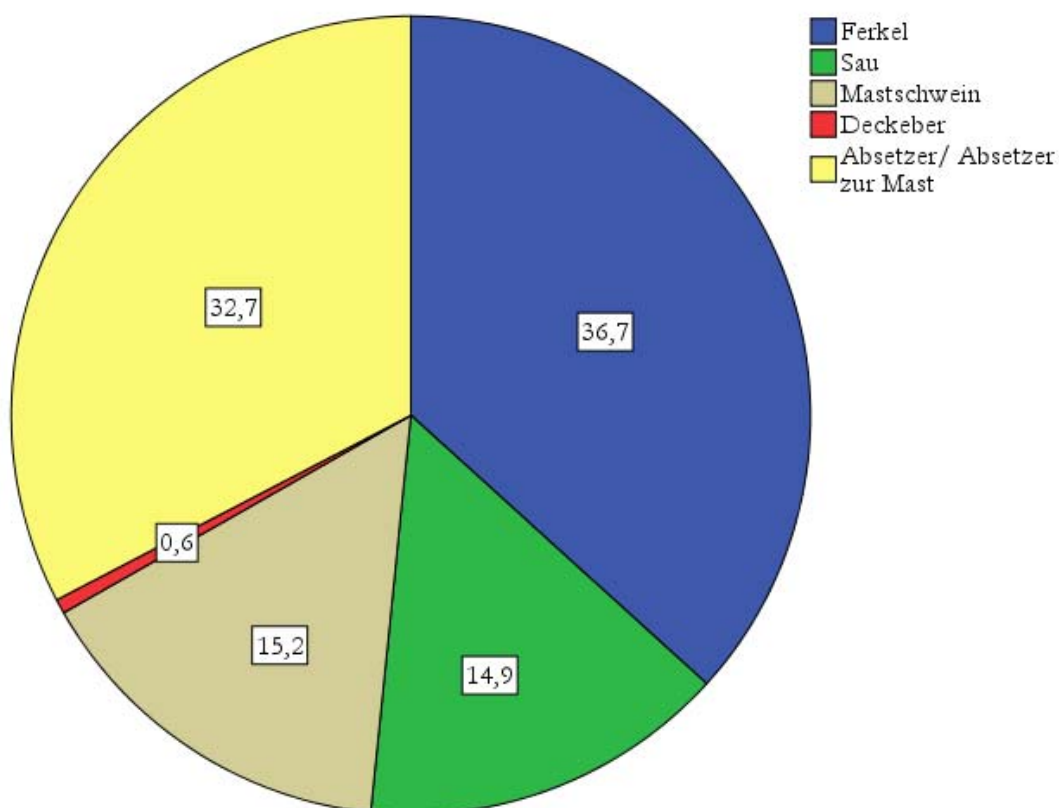


Abbildung 33: Anzahl der untersuchten Schweine, eingeteilt nach Altersklassen in Prozent.

Die höchste MRSA-Prävalenz lag bei den Absetzern mit 64,3 % und die geringste bei den Sauen mit 33,3 %. Der Unterschied des MRSA-Vorkommens bei Sauen und Absetzern ist signifikant mit $p=0,001$. Die Prävalenz der Ferkel lag bei 42,9 %, die der Mastschweine bei 53,8 % und die der Deckeiber bei 50 %. Die Gesamtprävalenz mit 172 MRSA-positiven Schweinen von 343 beprobten Schweinen lag bei 50,1 %.

		MRSA-		Prävalenz
		positiv	negativ	
Absetzer/	Anzahl	72	40	112
Absetzer zur Mast	% der	21,0 %	11,7 %	32,7 %
(= neu im Flatdeck)	Gesamtzahl			
Ferkel	Anzahl	54	72	126
	% der	15,7 %	21,0 %	36,7 %
	Gesamtzahl			
Mastschwein	Anzahl	28	24	52
	% der	8,2 %	7,0 %	15,2 %
	Gesamtzahl			
Sau	Anzahl	17	34	51
	% der	5,0 %	9,9 %	14,9 %
	Gesamtzahl			
Deckeiber	Anzahl	1	1	2
	% der	0,3 %	0,3 %	0,6 %
	Gesamtzahl			
Gesamt	Anzahl	172	171	343
	% der	50,1 %	49,9 %	100,0 %
	Gesamtzahl			

Tabelle 14: Prävalenzen der unterschiedlichen beprobten Altersklassen ($p=0,001$).

4.2 MRSA-Prävalenz bei Landwirten, Tierärzten und Studenten

Auf freiwilliger Basis wurden die auf den Höfen arbeitenden Landwirte beprobt. Auch anwesende Tierärzte sowie Studenten der Veterinärmedizin im 9. und 10. Semester, im Rahmen der klinischen Rotation in der Schweineklinik in Gießen, konnten sich mittels Nasentupfer selbst beproben und einen freiwilligen Fragebogen ausfüllen.

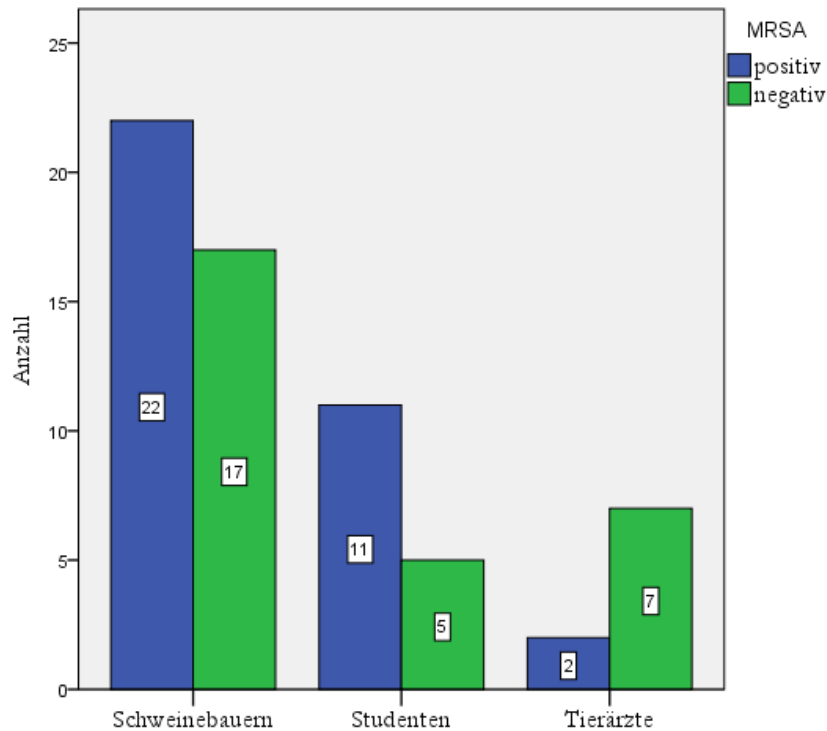


Abbildung 34: Anzahl MRSA-positiver und -negativer Landwirte, Tierärzte und Tiermedizinstudenten.

Insgesamt konnten 39 Landwirte, 9 Tierärzte und 16 Studenten beprobt werden. Die Landwirte wiesen eine MRSA-Prävalenz von 56,4 % ($n=22/39$) auf, die Tierärzte von 22,2 % ($n=2/9$) und die Studenten von 68,8 % ($n=11/16$).

Anzahl	MRSA-		Gesamt	Prävalenz
	positiv	negativ		
Landwirte	22	17	39	56,4 %
Tierärzte	2	7	9	22,2 %
Tiermedizinstudenten	11	5	16	68,8 %
Gesamt	35	29	64	54,7 %

Tabelle 15: Anzahl der entnommenen Nasentupfer bei beruflich in Schweinekontakt stehenden Menschen ($p=0,076$).

In insgesamt 15 Betrieben waren die Landwirte und ihre eigenen Schweine Träger von MRSA ($n=15/27$). In einem Betrieb waren nur der Landwirt aber weder seine Schweine noch die Umgebungsproben mit MRSA befallen. In drei Betrieben waren die Schweine mit MRSA kolonisiert ohne, dass die entsprechenden Landwirte des Hofes damit kolonisiert wurden.

		Isolate MRSA besiedelter			Gesamt
		Landwirte	Schweine	Umgebung	
Betrieb	2	1	13	1	15
Nr.	3	0	0	1	1
	5	2	10	0	12
	7A	1	5	3	9
	7B	1	11	4	16
	9	-	14	5	19
	10	3	4	7	14
	11	1	12	6	19
	12	2	17	5	24
	13	0	3	2	5
	14	1	11	5	17
	15	1	9	4	14
	16	0	0	1	1
	18	1	0	0	1
	19	-	3	3	6
	20	-	5	1	6
	21	-	1	1	2
	22	1	3	1	5
	23	0	6	2	8
	24	2	9	6	17
	25	1	10	4	15
	26	1	10	3	14
	27	1	9	3	13
	28	2	7	4	13
Gesamt		22	172	72	266

Tabelle 16: Anzahl der nasal mit MRSA-besiedelten Bauern in jedem Betrieb.

Zum besseren Vergleich wurden auch die MRSA-positiven Schweine und Umgebungsproben aufgelistet. In grün markierten Betrieben waren sowohl die Landwirte als auch die Schweine mit MRSA-kolonisiert. In dem rot markierten Betrieb war nur der Landwirt mit MRSA nasal kolonisiert aber weder seine Schweine noch die Umgebungsproben aus seinem Stall ($p=0,502$).

4.3 MRSA-Prävalenz von Umgebungsproben

Insgesamt wurden 128 Umgebungsproben gesammelt und analysiert. Darunter waren 42 Tupferproben von Spielketten (32,8 %) und 28 Tupferproben von Tränken (21,9 %), als Gegenständen mit direktem Schweinekontakt, sowie 30 Sockentupfer (23,4 %) des Stallbodens und 28 Staubproben (21,9 %) aus den beprobten Ställen.

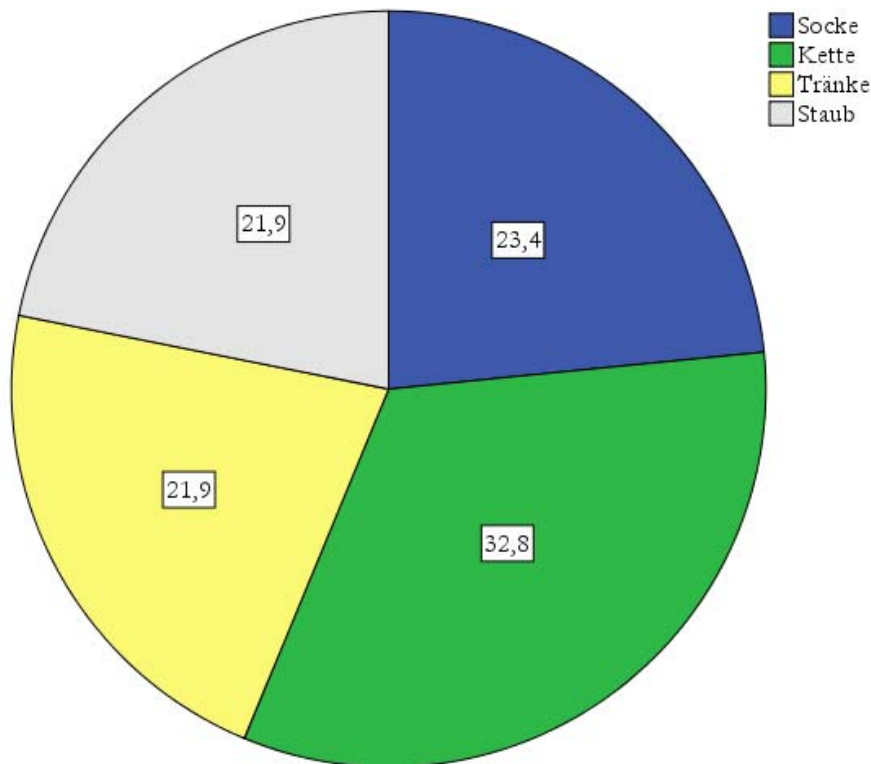


Abbildung 35: Anteil der entnommenen Umgebungsproben in Prozent.

Von den 128 Umgebungsproben konnten bei insgesamt 72 Proben MRSA nachgewiesen werden (56,3 %). Darunter waren 22 von 42 Spielketten (52,4 %), 14 von 28 Tränken (50 %), 21 von 30 Sockentupfern (70 %) und 15 von 28 Staubproben (53,6 %), MRSA positiv. Die Proben dienten dazu, das MRSA-Vorkommen in der direkten Umgebung der Schweine zu analysieren, da MRSA im Staub und an Gegenständen anhaftend über Monate überleben können und somit eine ständige Infektionsquelle darstellen. In jedem Betrieb wurde mindestens eine Tupferprobe von Tränken und Spielketten, falls diese vorhanden waren sowie mindestens eine Staubprobe und ein Sockentupfer entnommen. Ein Betrieb galt in Bezug auf die Umgebungsproben als MRSA-positiv, wenn in mindestens einer der Umgebungsproben MRSA nachgewiesen wurden.

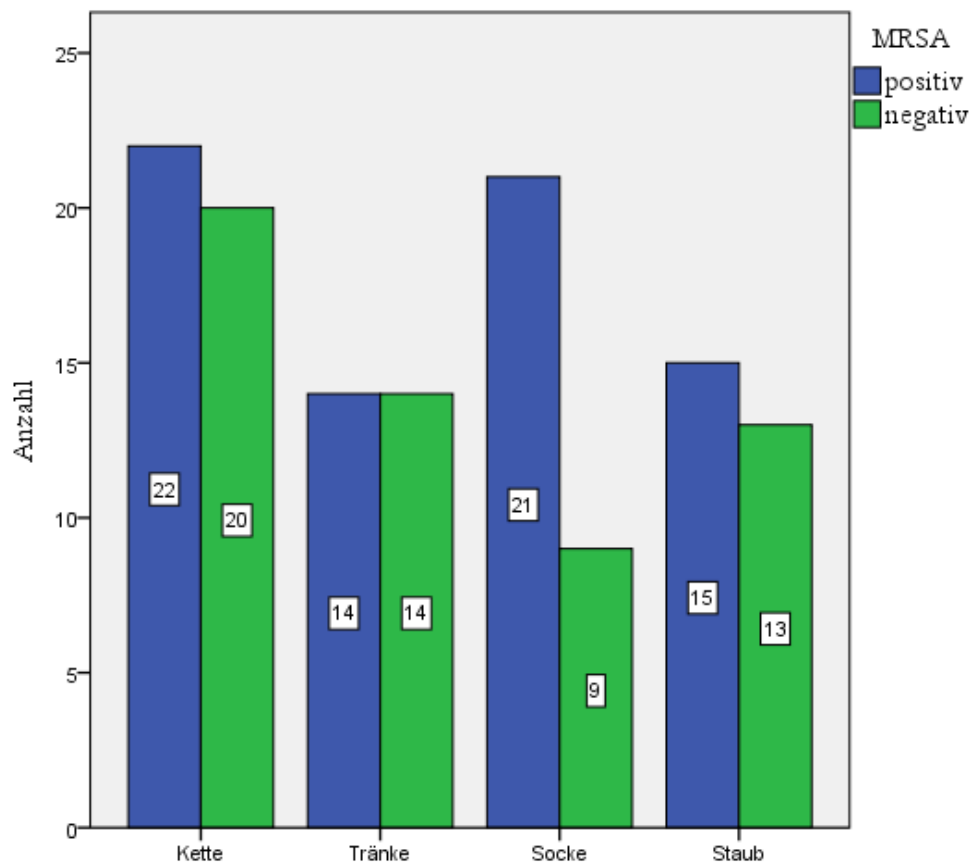


Abbildung 36: Anzahl MRSA-positiver und negativer Umgebungsproben aufgeteilt nach Ketten, Tränken, Socken und Staub ($p=0,379$).























		MRSA-positive Proben/ Gesamtzahl				Gesamt	Prävalenz
		Tränken	Ketten	Socken	Staub		
Betrieb	1	0/1	0/2	0/2	0/2	0/7	0 %
	2 	0/0	0/0	0/2	1/1	1/3	33,3 %
	3	0/1	0/1	1/1	0/1	1/4	25 %
	4	0/1	0/1	0/1	0/1	0/4	0 %
	5 	0/0	0/0	0/1	0/1	0/2	0 %
	1=6	0/1	0/1	0/1	0/1	0/4	0 %
	7A 	0/1	1/1	0/0	2/2	3/4	75 %
	7B 	0/0	2/2	1/1	1/1	4/4	100 %
	9 	2/2	1/1	1/1	1/1	5/5	100 %
	10 	2/3	3/3	1/1	1/1	7/8	87,5 %
	11 	1/1	2/2	2/2	1/1	6/6	100 %
	12 	1/1	4/4	0/0	0/0	5/5	100 %
	13 	1/2	0/3	1/1	0/0	2/6	33,3 %
	14 	1/1	2/2	1/1	1/1	5/5	100 %
	15 	1/1	1/1	1/1	1/1	4/4	100 %
	16	0/1	0/1	1/1	0/1	1/4	25 %
	17	0/3	0/3	0/1	0/1	0/8	0 %
	18 	0/2	0/1	0/1	0/1	0/5	0 %
	19 	0/0	2/2	1/1	0/0	3/3	100 %
	20 	0/0	0/1	1/1	0/1	1/3	33,3 %
	21 	0/0	0/1	1/1	0/1	1/3	33,3 %
	22 	0/0	0/1	1/1	0/1	1/3	33,3 %
	23 	0/0	0/1	1/1	1/1	2/3	66,7 %
	24 	2/2	2/2	1/1	1/1	6/6	100 %
	25 	1/1	1/1	1/1	1/1	4/4	100 %
	26 	1/1	0/1	1/1	1/1	3/4	75 %
	27 	1/1	1/1	1/1	0/1	3/4	75 %
	28 	0/1	0/2	2/2	2/2	2/7	28,6 %
Gesamt		14/28	22/42	21/30	15/28	72/128	56,3 %
Prävalenz		50 %	52,4 %	70 %	53,6 %		
Ø Prävalenz der 27 verschiedenen Betriebe						Ø67,5 %	

Tabelle 17: Umgebungsproben pro Betrieb, in denen MRSA nachgewiesen wurden, mit Gesamtanzahl, Prävalenz an positiven Umgebungsproben pro Betrieb und Ø Prävalenz.

In den grün markierten Betrieben waren die Schweine mit MRSA-kolonisiert und in den rot markierten die Landwirte des Betriebes.

4.4 MRSA-Vorkommen nach geographischer Verteilung

Von den 27 untersuchten Betrieben lagen zwölf in Hessen, zwei in Baden-Württemberg, zwei in Nordrheinwestfalen und 11 in Niedersachsen.

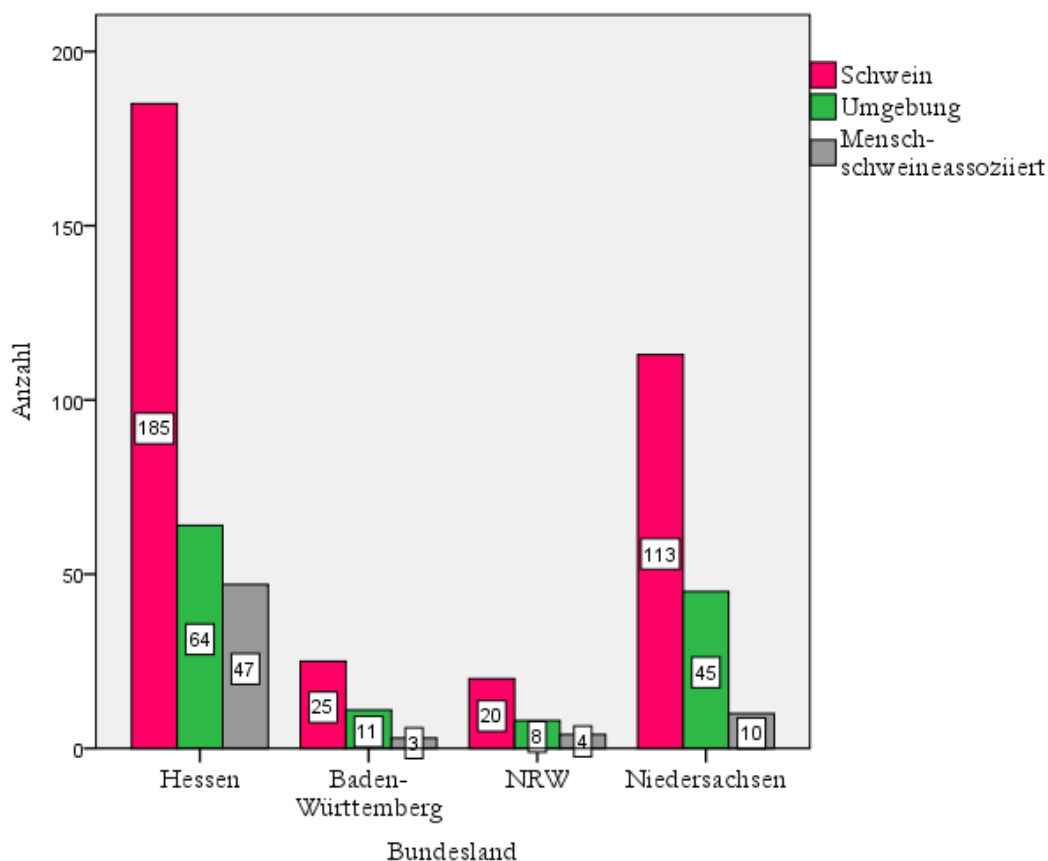


Abbildung 37: Anzahl der entnommenen Nasentupferproben von Schweinen, Landwirten, Tierärzten und Studenten sowie Umgebungsproben je Bundesland.

Die höchste MRSA-Prävalenz bei den Schweinen kam in Baden-Württemberg vor mit 56 % ($n=14/25$) und auch dort bei den Umgebungsproben mit 63,6 % ($n=7/11$). Die geringste Prävalenz bei den beprobten Menschen in den Schweinebetrieben wies NRW auf mit 25 %, die höchste Hessen mit 48,9 %. Der Mittelwert lag bei 54,7 %. Die MRSA-Prävalenz bei Schweinen lag in den untersuchten Bundesländern zwischen 45 % und 56 %, mit einem Mittelwert von 50,2

% . Die MRSA-Prävalenz der Umgebungsproben erstreckte sich zwischen 50 % in Hessen und 63,6 % in Baden-Württemberg, mit einem Mittelwert von 56,3 % ($p=0,538$).

Bundesland	MRSA/ entnommene Proben und Prozentsatz			MRSA/Gesamt Prävalenz
	Landwirte, Tierärzte und Studenten	Schwein	Umgebung	
Hessen	23/47	86/185	32/64	141/296
	48,9 %	46,5 %	50 %	47,7 %
Baden-Württemberg	1/3	14/25	7/11	22/39
	33,3 %	56 %	63,6 %	56,4 %
NRW	1/4	9/20	5/8	15/ 32
	25 %	45 %	62,5 %	46,9 %
Niedersachsen	10/10	63/113	28/45	101/ 168
	100 %	55,8 %	62,2 %	60,1 %
Gesamt	35/ 64	172/ 343	72/ 128	279/ 535
	54,7 %	50,2 %	56,3 %	52,1 %

Tabelle 18: Anzahl der MRSA-positiven Proben in Hessen, Baden-Württemberg, NRW und Niedersachsen.

Betriebsprävalenz in den verschiedenen Bundesländern anhand der unterschiedlichen Proben	Schweine und Umgebung	Schweine	Umgebung
Hessen	75 % (n=9/12)	75 % (n=9/12)	75 % (n=9/12)
Baden-Württemberg	100 % (n=2/2)	100 % (n=2/2)	50 % (n=1/2)
NRW	100 % (n=2/2)	50 % (n=1/2)	100 % (n=2/2)
Niedersachsen	90,9 % (n=10/11)	90,9 % (n=10/11)	90,9 % (n=10/11)

Tabelle 19: MRSA-Prävalenz in den Betrieben der untersuchten Bundesländer.

4.5 MRSA in unterschiedlichen Betriebsstrukturen

Unter den 27 untersuchten Betrieben waren vierzehn Betriebe (51,9 %) mit Ferkelerzeugung und Mastschweinen, sieben reine Mastbetriebe (25,9 %), fünf reine Ferkelerzeuger (18,5 %) und ein Jungsauenproduzent (3,7 %).

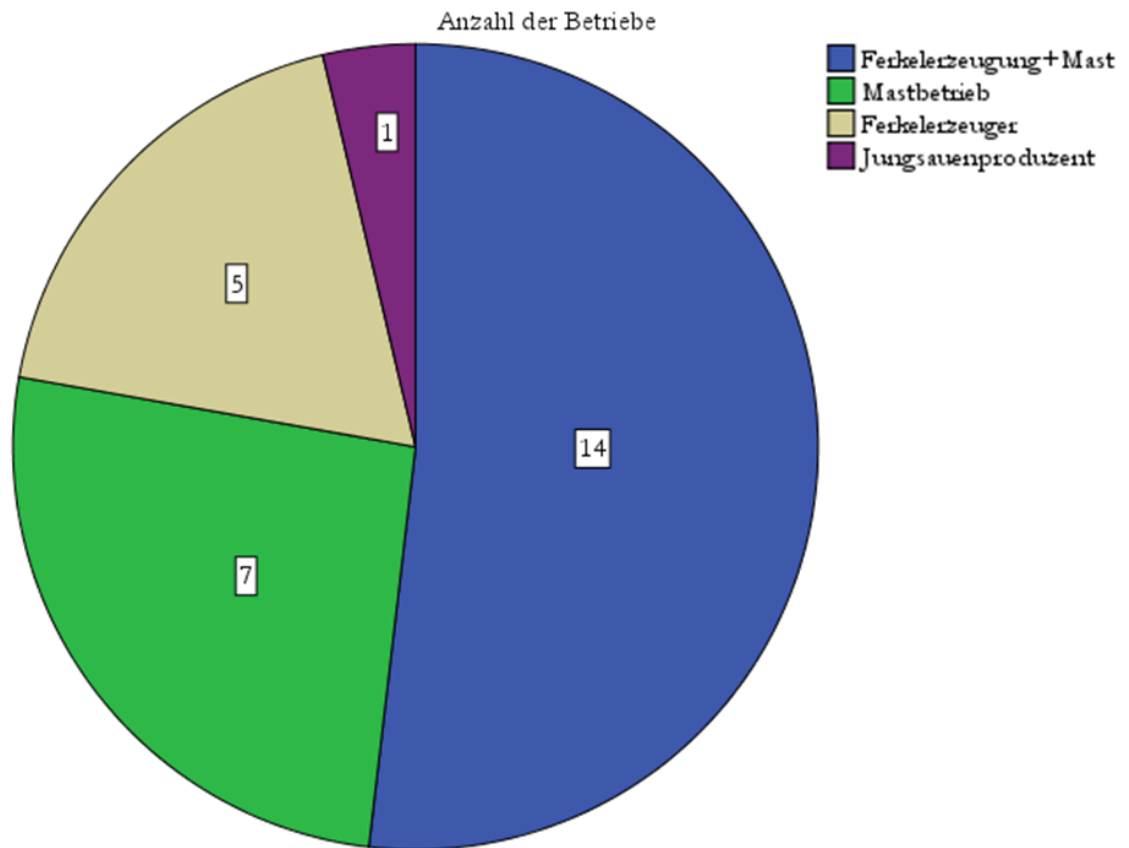


Abbildung 38: Anzahl der untersuchten Betriebe unterschiedlicher Betriebsstruktur.

Die höchste MRSA-Prävalenz wies der Jungsauenproduzent mit 100 % auf, allerdings wurde insgesamt nur ein einziger Jungsauenbetrieb untersucht. Die zweithöchste Prävalenz zeigten die Ferkelerzeuger mit 78,6 %, mit einer Differenz von 7,2 % im Vergleich zu den reinen Mastbetrieben mit einer Prävalenzrate von 71,4 %. Der errechnete Prävalenzmittelwert lag bei 82,5 %.

Betriebsart	Anzahl der Betriebe mit MRSA-Status der Schweine		Positiv/Gesamt	Prävalenz
	Positiv	Negativ		
Jungsauen- produzent	1	0	1/1	100 %
Ferkelerzeuger	4	1	4/5	80 %
Mastbetrieb	5	2	5/7	71,4 %
Ferkelerzeugung+ Mast	11	3	11/14	78,6 %
Gesamt	21	6	21/27	77,8 %
Ø Mittelwert				82,5 %

Tabelle 20: Anzahl der Betriebe mit MRSA-kolonisierten Schweinen geordnet nach Betriebsart (p=0,926).

4.6 Angaben der Landwirte über Antibiotikagaben in ihrem Betrieb

In den 27 verschiedenen Betrieben wurden die Schweine bis zur Beprobung mit verschiedenen Antibiotika behandelt. Das häufigste verwendete Antibiotikum war Penicillin, mit einem Anteil von 29,6 %, als alleiniges Antibiotikum, in den untersuchten Betrieben und mit zusätzlich einem Anteil von 3,7 % der Antibiotikagaben zusammen mit Amoxicillin. Allerdings wurden in 22,2 % der untersuchten Betrieben keine Angaben zu Antibiotikagaben gemacht und 7,4 % der Betriebe gaben an keine Antibiotika verwendet zu haben.

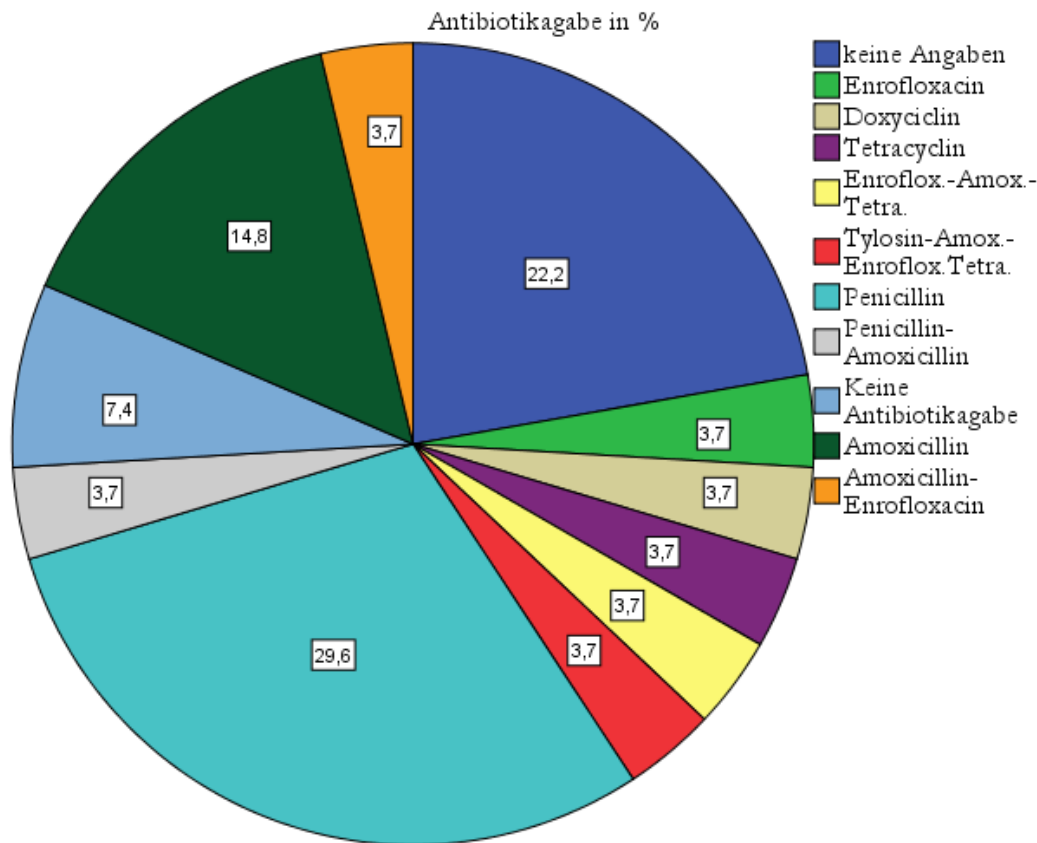


Abbildung 39: Antibiotikagaben in Prozent in den untersuchten Betrieben.

Die folgende Grafik zeigt die untersuchten 27 Betriebe und gibt an wie viele Betriebe, eingeteilt nach Antibiotikanutzung, MRSA-positive oder negativ waren, gemessen am MRSA-Status ihrer Schweine. Der Einfluss der Antibiotikagabe auf den MRSA-Status war nicht signifikant ($p=0,163$). Allerdings fällt auf, dass v.a. Schweinebetriebe mit der Gabe von Penicillin und anderen beta-Laktamen eine höhere MRSA-Prävalenz aufweisen als Betrieben mit anderen Antibiotikaklassen. In Betrieben mit alleiniger Penicillingabe lag die MRSA-Prävalenz bei 87,5 % ($n=7/8$) und sogar bei 100 % bei der alleinigen Gabe von Amoxicillin.

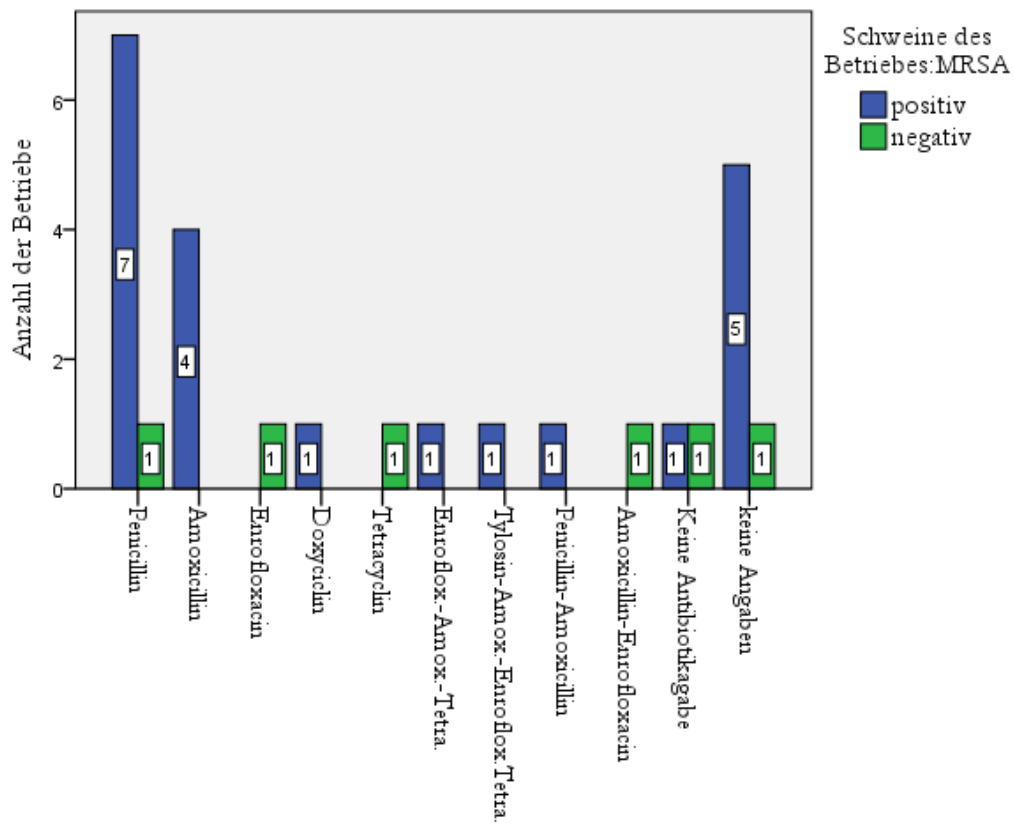


Abbildung 40: MRSA-positive und negative Betriebe, ermittelt durch den MRSA-Status ihrer Schweine und eingeteilt nach Antibiotikagaben.

Teil II. Ergebnisse der MRSA-Anzucht

4.7 Ergebnisse der MRSA-Anzucht der schweineassoziierten Proben: Anzucht, Katalase-, Pastorex-Staph-Plus Test, MALDI-TOF und Vitek2

Nach der MRSA-Anzucht in der CASO-Bouillon, auf dem COS-5 %-Agar und MRSA-ID-Agar, mit Bestätigung durch den Katalase-Test und den Pastorex-Staph-Plus-Test wurden zunächst insgesamt 291 (100 %) Isolate untersucht. Darunter waren Isolate von 175 Schweinen (60,1 %), 74 Umgebungsproben (25,4 %) und 43 schweineassoziierten Menschen (14,8 %), mit positivem MRSA-Befund. Diese wurden zur weiteren Bestätigung mittels MALDI-TOF untersucht. Der MALDI-TOF befand, außer eine Umgebungsprobe, alle schweineassoziierten Isolate für *S. aureus*. Das einzige Isolat, das laut MALDI-TOF kein *S. aureus* war, war eine Umgebungsprobe, bei der es sich um *S. sciuri* handelte (0,3 %).

Alle Isolate, die zuvor im MALDI-TOF waren, wurden mittels VITEK2 nochmals auf *S. aureus*, sowie ihre Methicillinresistenz zur MRSA-Bestätigung, untersucht. Der Vitek2 bestätigte die eine Umgebungsprobe (0,3 %) auch als Methicillin-resistenten *S. sciuri* und fand unter den *S. aureus* Isolaten von Schweinen zwei MSSA (0,7 %). Die restlichen *S. aureus* wurden alle durch den VITEK2 auch als MRSA identifiziert (99 %).

					Gesamt
		Schwein	Umgebung	Schweine-assozierte Menschen	
Vitek	MRSA	173	72	43	288
	<i>S. sciuri</i>	0	1	0	1
	MSSA	2	0	0	2
Gesamt		175	73	43	291

Tabelle 21: Ergebnisse des VITEK2.

Unter den 173 Schweinen die durch den VITEK2 als MRSA bestätigt wurden fand der Microarray noch einen MSSA und unter den schweineassoziierten Menschenisolaten noch sechs MSSA, so dass insgesamt 172 Isolate, von insgesamt 343 Schweinen (50,1 %), 72 von 128 Umgebungsprobenisolaten (56,3 %) und 35 von 64 Isolaten beprobter Menschen (54,7 %) mit Schweinekontakt, MRSA-positiv waren.

4.8 MRSA der Krankenhauspatienten: Die Ergebnisse der PCR der Krankenhauspatienten

Insgesamt wurden 163 Patienten des Uniklinikums Heidelberg ausgewählt, um ihre MRSA mit denen der schweineassoziierten MRSA zu vergleichen. Die Patienten wurden alle im Jahr 2012 von Ärzten im Uniklinikum Heidelberg untersucht und in 81 kolonisierte Patienten, mit MRSA in der Nase oder auf der Haut, sowie 79 Patienten mit MRSA in primär sterilen Materialien (invasiv), wie z.B. Blut, Urin oder sterilen Operationswunden eingeteilt. Alle ausgewählten und untersuchten MRSA-Isolate erwiesen sich in der Anzucht mittels CASO-Bouillon, COS-5 %-Agar und MRSA-ID-Agar sowie im MALDI-TOF als *S. aureus*. Ihre Methicillinresistenz wurde mit dem VITEK2 und der *mecA*-/*femB*-PCR bestätigt.

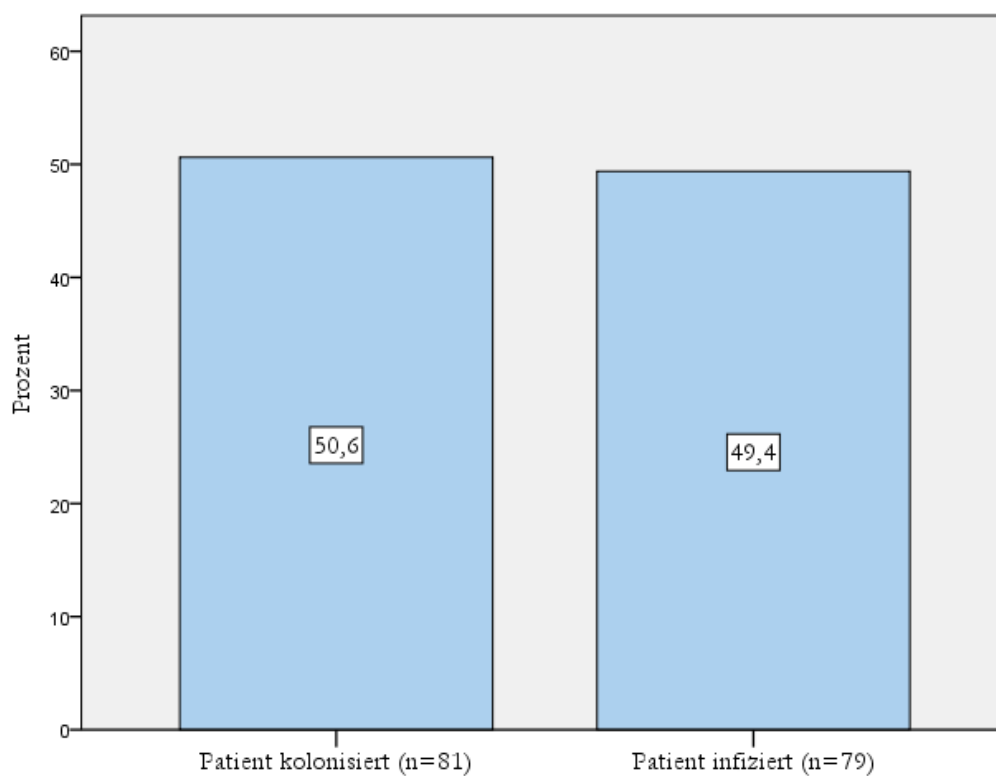


Abbildung 41: Ausgewählte humane MRSA-Isolate zum späteren Vergleich mit den MRSA-Isolaten aus Schweinebetrieben.

Teil III. Vergleich humaner und porciner MRSA unter besonderer Berücksichtigung der Virulenzfaktoren

4.9 Genotypisierung mittels Microarray

Im Microarray wurden insgesamt 399 MRSA aus deutschen Schweinebeständen und dem Uniklinikum Heidelberg untersucht. Weitere 7 MSSA Isolate und die erhaltenen MRSA-Isolate aus Europa wurden gesondert untersucht und dargestellt. Alle zuvor gefundenen MRSA-Isolate von Schweinen und schweineassoziierten Menschen wurden angezüchtet. Eine DNA-Isolation fand statt, um sie mit dem Microarray genotypisieren zu können. Von den Umgebungsproben wurden aus Kostengründen nicht alle, jedoch mindestens ein Sockentupfer oder eine Sammelstaubprobe sowie eine Probe eines Gegenstandes mit direktem Schweinekontakt, also eine Tränke- oder Spielkettenproben, falls sie positiv und anzuzüchten waren, genotypisiert.

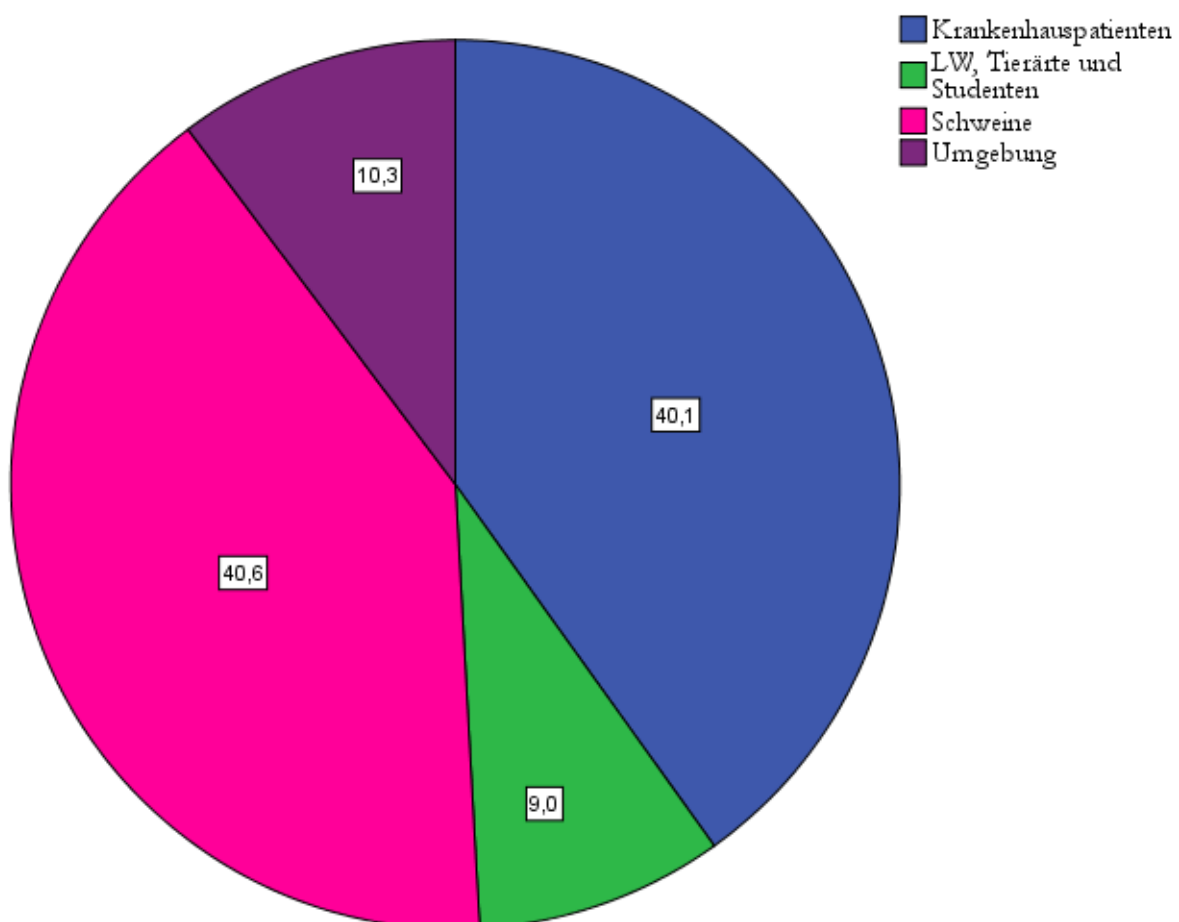


Abbildung 42: MRSA-Isolate, die mit dem Microarray untersucht wurden in Prozent.

Es wurden insgesamt weniger Schweine und schweineassoziierte-Menschenisolate genotypisiert, da einige Isolate nach dem Einfrieren nicht mehr anzuzüchten waren oder auch nach wiederholten Versuchen nicht vom Microarray erkannt wurden und aus Kostengründen nicht alle Umgebungsproben analysiert werden konnten.

Zur Genotypisierung konnten 140 Krankenhauspatienten und 132 Schweine mit dem Microarray analysiert und verglichen werden. Weitere 33 Isolate von Landwirten, Tierärzten und Studenten sowie 33 Umgebungsproben wurden auch genotypisiert und deren Virulenzfaktoren bestimmt.

Von den untersuchten 338 MRSA-Isolaten konnte insgesamt bei 20 Isolaten (5,9 %) vom Microarray keine *SCC_{mec}* aber ein CC zugeordnet werden. Von diesen 20 Isolaten wurden aber auch alle Virulenzfaktoren genau identifiziert und die Isolate wurden in die Auswertung mit aufgenommen.

Das folgende Diagramm gibt alle CC der Isolate von Krankenhauspatienten, Schweinen, schweineassoziierten Menschen und der Umgebungsproben an und zeigt, dass alle Schweine- und alle anderen schweineassoziierten Isolate dem CC398 angehören. Der häufigste CC, der unter den Isolaten der Krankenhauspatienten vorkam, war der CC5 (62,9 %, n=88/140) und fünf Patienten (3,6 %) gehören zu dem CC398, der in den Schweinebetrieben dominierte. Die Anzahl der CC pro analysierte Gruppe ist hochsignifikant mit $p < 0,001$.

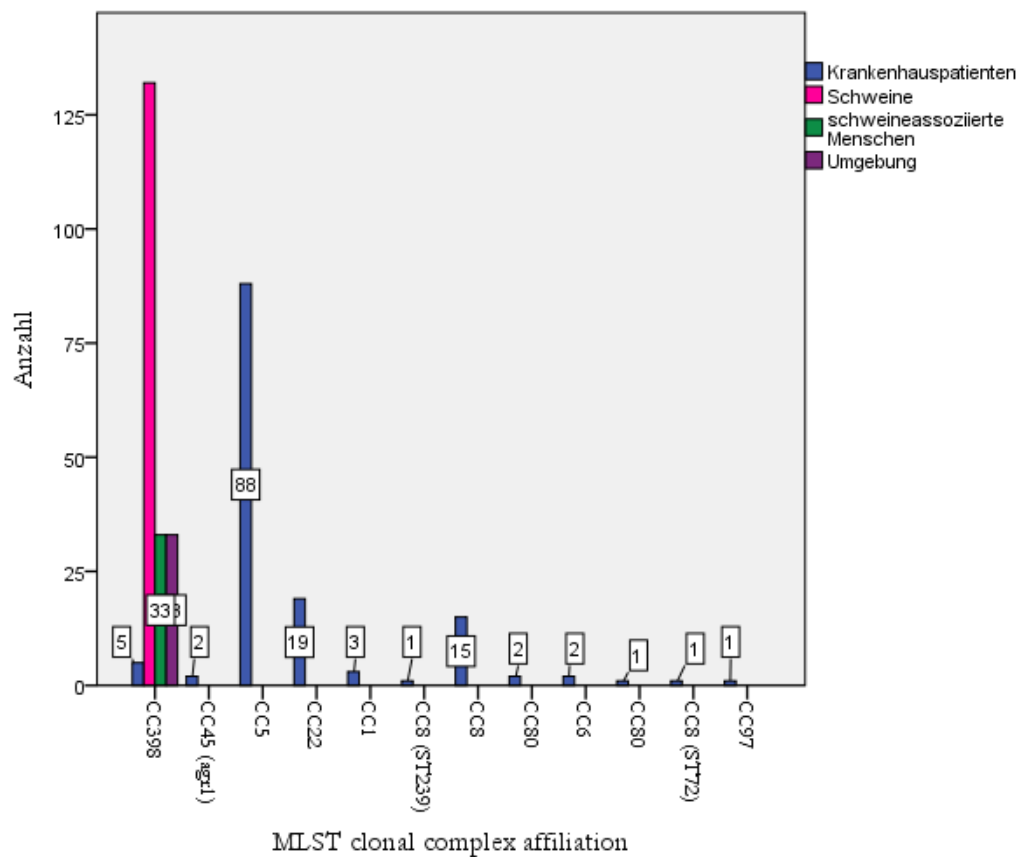


Abbildung 43: CC der untersuchten Isolate.

Unter den Krankenhauspatienten wurden insgesamt 24 verschiedene MRSA-Sequenztypen gefunden, von denen der ST5/ST225-MRSA-II der dominierende war mit 76 von 140 untersuchten Isolaten, die im Microarray genotypisiert wurden (54,3 %). Am zweithäufigsten kam der CC22-MRSA-IV unter den Krankenhauspatienten vor (8,6 %). Der CC398, der als alleiniger CC bei den Menschen aus den deutschen Schweinebetrieben vorkam, kam bei fünf MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten ($n=5/140$, 3,8 %) vor. Der Unterschied zwischen dem Vorkommen der einzelnen CC ist hochsignifikant ($p<0,001$).

Stamm	MRSA der				Gesamt
	Krankenhaus- patienten	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umge- bung	
CC398-V	3	112	29	24	168
CC398-IV	0	9	2	4	15
ST5/ST225-MRSAII, UK-EMRSA-3/Rhine-Hessen EMRSA	76	0	0	0	76
CC22-MRSA-IV, UK-EMRSA-15/Barnim EMRSA	12	0	0	0	12
CC1-MRSA-IV, WA MRSA-1/57	3	0	0	0	3
ST228-MRSA-I, South German EMRSA/Italian Clone	1	0	0	0	1
CC45-MRSA-IV, Berlin EMRSA	2	0	0	0	2
ST293-MRSA-III, Vienna/Hungarian/Brazilian Clone	1	0	0	0	1
CC8-MRSA-IV, Lyon Clone (sea-neg. Variant)/WA MRSA-88	2	0	0	0	2
CC-5-MRSA-IV, Pediatric clone (PVL+)	2	0	0	0	2
CC8-MRSA-IV(sea+), Lyon Clone/UK-EMRSA-2	9	0	0	0	9
CC80-MRSA-IV, (PVL+), European CA-MRSA Clone	1	0	0	0	1

ST8-MRSA-IV (PVL+/ACME-), ACME-negative Variant of USA300	1	0	0	0	1
CC5-MRSAIV, Paediatric clone	1	0	0	0	1
ST8-MRSA-IV (PVL+/ACME+), USA300	1	0	0	0	1
CC6-MRSA IV, WA MRSA-51	2	0	0	0	2
CC22-MRSA-IV (tst1+), UK-EMRSA-15/"Middle Eastern Variant"	4	0	0	0	4
CC398-MRSA(truncated/atypical SCCmec)	1	5	0	2	8
CC5MRSAIV, paediatric clone(sed/i/r+)	2	0	0	0	2
CC5, -MRSA with atypical SCCmec element "Montreal strainI"	1	0	0	0	1
ST8-MRSA-IV [PVL+/ACME+], USA300	1	0	0	0	1
CC5-MRSA-IV, "Maltese Clone"	2	0	0	0	2
CC88-MRSA-IV [PVL+]	1	0	0	0	1
ST8-MRSA-IIA/B/D, Irish AR13/14	1	0	0	0	1
ST72-MRSA-IV, USA700	1	0	0	0	1
Eine Zuordnung zu einem ST mit SCCmec war nicht möglich, obwohl der CC erkannt wurde	9	6	2	3	20
Gesamt	140	132	33	33	338

Tabelle 22: ST/CC mit SCCmec Zuordnung der analysierten MRSA von Krankenhauspatienten und aus Schweinebeständen.

(**Anmerkung:** Der Microarray bezeichnet den Clonal Complex als solchen als CC und gibt den ST mit Angabe der *SCCmec* entweder z.B. als ST398-V oder als CC398-V wieder, was als eine identische Bezeichnung anzusehen ist.)

Bei den Schweinen konnten drei verschiedene ST identifiziert werden, wobei der CC398-V der dominierende war mit 112 von 132 untersuchten Isolaten (84,8 %). Weitere neun Isolate gehörten dem CC398-IV (6,8 %) an und nur fünf weitere Isolate (3,8 %) einem CC398 mit atypischer *SCCmec*. Keine *SCCmec* konnten insgesamt sechs Schweineisolaten (4,5%) zugeordnet werden, sie waren aber zuvor schon als CC398 identifiziert worden, allerdings ohne *SCCmec*-Zuordnung.

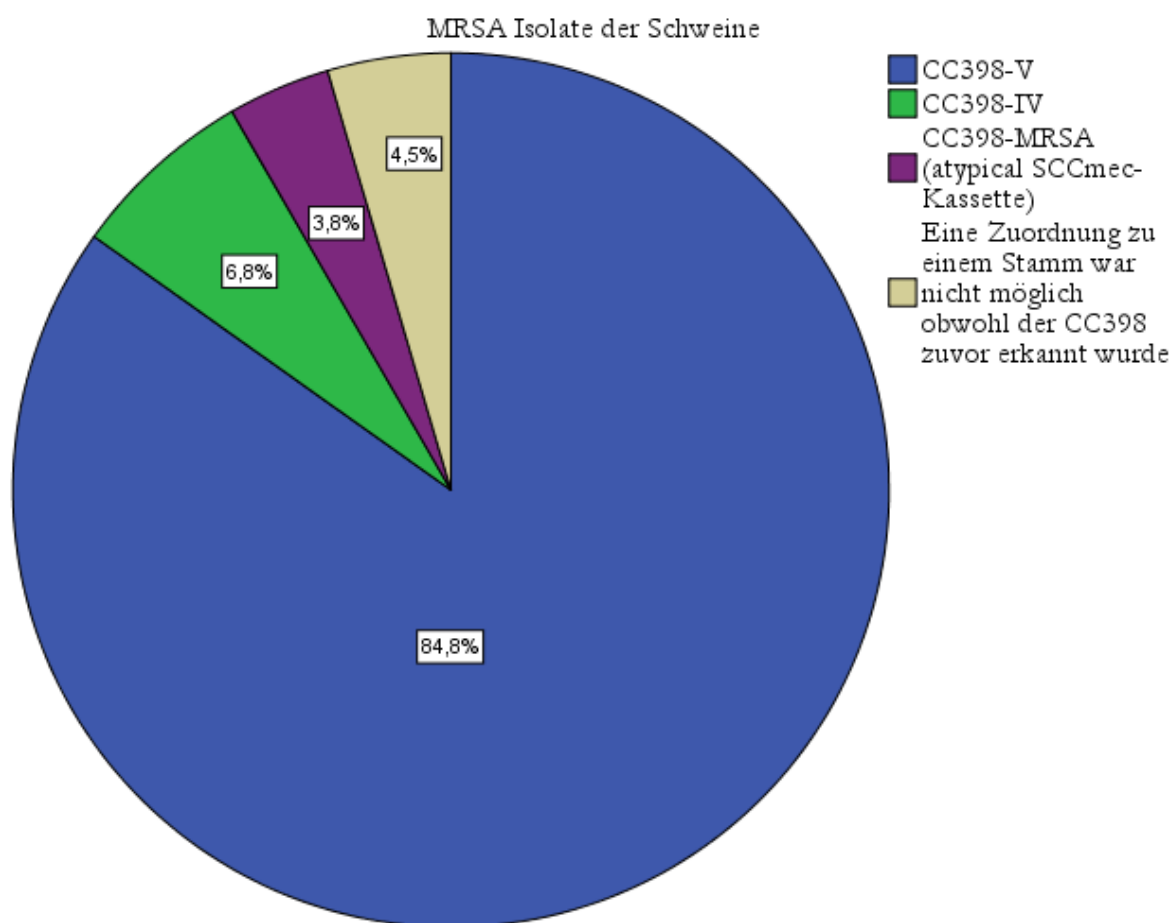


Abbildung 44: Identifizierte CC mit *SCCmec* der porcinen MRSA in Prozent.

Unter den Isolaten von schweineassoziierten Menschen wurden zwei verschiedene ST gefunden, von denen 29 von 33 zu dem CC398-V gehörten (87,8 %) und zwei zu dem CC398-IV (6,1 %). Insgesamt konnten zwei Isolate von schweineassoziierte Menschen (6,1 %) zwar keiner *SCCmec*

näher zugeordnet werden aber auch sie waren zuvor als CC398 identifiziert worden ohne eine mögliche *SCCmec* Zuordnung. Auch unter den Umgebungsproben war nur der ST398 mit drei verschiedenen *SCCmec* zu finden. Davon gehörten 72,7 % dem CC398-V ($n=24/33$), 12,1 % dem CC398-IV ($n=4/33$) und 6,1 % dem CC398 mit atypischer *SCCmec* ($n=2/33$) an. Von den Umgebungsproben konnten drei von 33 Isolaten (9,1 %) nur dem CC398 und keiner genauen *SCCmec* zugeordnet werden.

4.9.1 Genotyp der MRSA verschiedener Schweinealtersklassen

Bei allen Schweinealtersklassen kam am Häufigsten der CC398-V, mit einer Prävalenz von 87,5 % der Isolate von Ferkeln ($n=35/40$), 85,7 % der Isolate von Sauen ($n=6/7$), 95,7 % der Mastschweinisolat ($n=22/23$) und 79 % der Isolate von Absetzern vor ($n=49/62$). Nur bei 14,5 % der MRSA-Isolate von Absetzern trat der ST398 mit *SCCmec*-IV auf ($n=6/62$).

	MRSA				Gesamt
	Ferkel	Sau	Mastschwein	Absetzer/ Absetzer für die Mast	
CC398-V	35	6	22	49	112
CC398-IV	0	0	0	9	9
CC398-MRSA(atypische <i>SCCmec</i>)	1	1	0	3	5
CC398 ohne genauere <i>SCCmec</i> Zuordnung	4	0	1	1	6
Gesamt	40	7	23	62	132

Tabelle 23: Genotyp der Schweine-MRSA-Isolate ($p=0,034$).

4.9.2 Genotyp der MRSA von Landwirten, Tierärzten und Studenten

Die untersuchten und identifizierten Isolate der Landwirte, Tierärzte und Studenten gehörten wie die der Schweine am Häufigsten zum CC398-V (87,9 %). Die Signifikanz des Vorkommens der ST unter den verschiedenen Gruppen ist mit $p=0,793$ gering.

	MRSA			Gesamt
	Landwirt	Tierarzt	Tier- medizin- student	
CC398-V	17	2	10	29
CC398-IV	2	0	0	2
Nur eine Zuordnung zum CC398 war möglich	1	0	1	2
Gesamt	20	2	11	33

Tabelle 24: Genotyp der MRSA-Isolate von Landwirten, Tierärzten und Studenten.

4.9.3 Genotyp der MRSA aus Umgebungsproben

Bei den analysierten Umgebungsproben konnte der Microarray den am Häufigsten vorkommenden CC398-V auch bei 71,4 % der Sockentupfer (n=10/14), 83,3 % der Staubproben (n=5/6), 87,5 % der Tränketupfer (n=7/8) und 40 % der Spielketten (n=2/5) identifizieren. Der CC398-IV trat bei 40 % der Ketten und 14,4 % der Sockentupfer auf.

	MRSA				Gesamt
	Socken	Staub	Tränke	Kette	
CC398-V	10	5	7	2	24
CC398-IV	2	0	0	2	4
CC398-MRSA(atypische <i>SCCmec</i>)	0	1	0	1	2
CC398 ohne genauere <i>SCCmec</i> -Zuordnung	2	0	1	0	3
Gesamt	14	6	8	5	33

Tabelle 25: Genotyp der Isolate von Umgebungsproben (p=0,237).

4.9.4 Genotyp der MRSA von Krankenhauspatienten

Von den 140 identifizierten MRSA-Isolaten von Patienten des Uniklinikums Heidelberg konnten insgesamt elf verschiedene CC identifiziert werden. Der Microarray ordnete 88 Isolate (62,9 %) dem CC5 zu, darunter 49 infizierte und 39 kolonisierte Krankenhauspatienten. Der CC398 wurde bei fünf Patientenisolaten (3,6 %) gefunden.

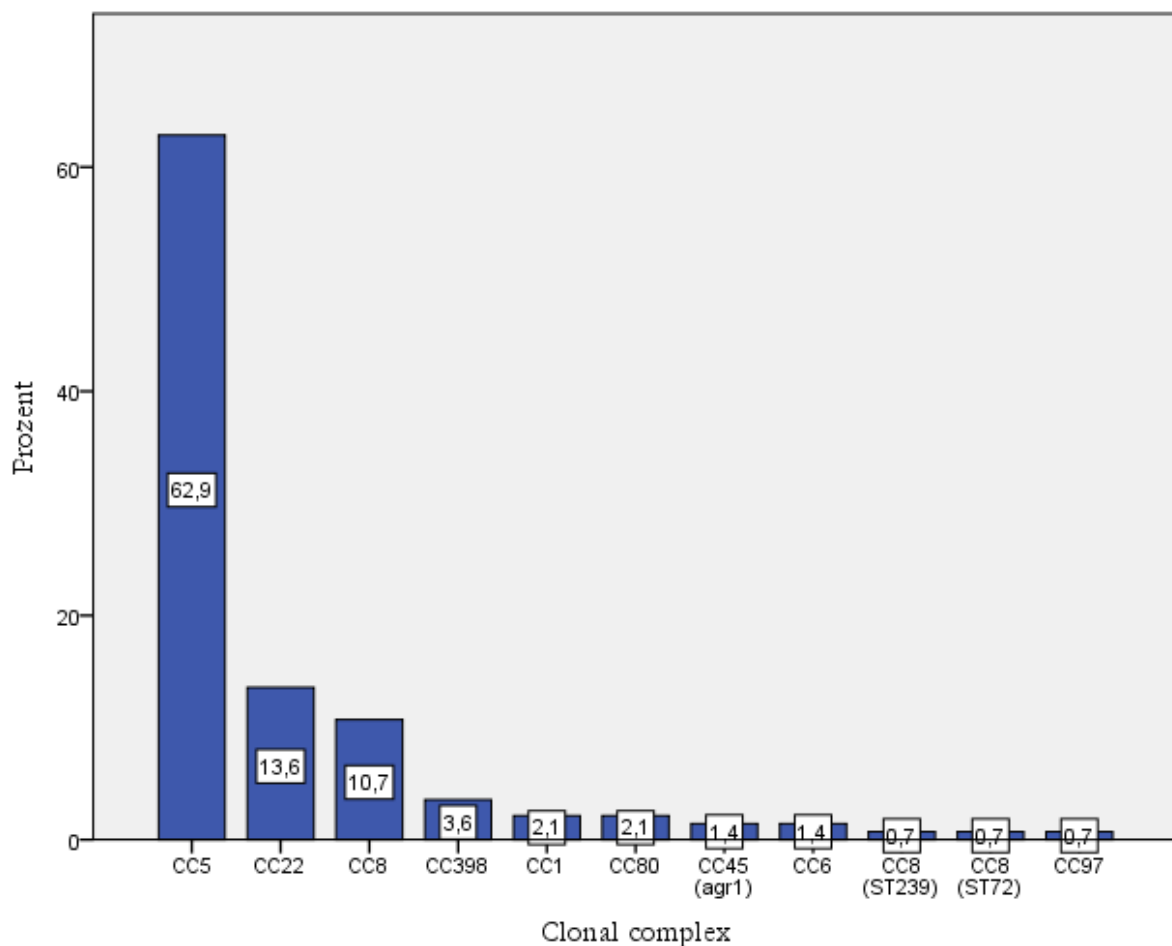


Abbildung 45: CC der MRSA der Krankenhauspatienten in Prozent ($p=0,28$).

Der ST5/ST225-MRSA-II/Rhein-Hessen-Stamm kam, mit 54,3 % als häufigster ST vor, sowohl bei den kolonisierten als auch bei den invasiv befallenen Patienten. Am zweithäufigsten wurde der CC22-MRSA-IV/Barnim-Stamm, mit einer Häufigkeit von 8,6 % unter den Krankenhauspatienten nachgewiesen. Die Isolate des CC398 ließen sich als CC398-V, zwei kolonisierten (1,4 %) und einem invasiv befallenen Patienten (0,7 %) zuordnen. Der CC398 mit atypischer *SCCmec* konnte einem invasiv (0,7 %) befallenen Patienten zugeordnet werden.

	Patient infiziert	MRSA Patient kolonisiert	Gesamt	Herkunft: HA-, CA LA-MRSA
CC398-V	1	2	3	LA
ST5/ST225-MRSAII, UK-EMRSA-3/Rhine-Hessen EMRSA	42	34	76	HA
CC22-MRSA-IV, UK-EMRSA-15/Barnim EMRSA	4	8	12	CA
CC1-MRSA-IV, WA MRSA-1/57	3	0	3	CA
Eine genaue Zuordnung zur SCCmec war nicht möglich (nur zum CC)	3	6	9	
ST228-MRSA-I, South German EMRSA/ Italian Clone	1	0	1	HA
CC45-MRSA-IV, Berlin EMRSA	2	0	2	CA
ST293-MRSA-III, Vienna/Hungarian/Brazilian Clone	0	1	1	HA
CC8-MRSA-IV, Lyon Clone (sea-neg. Variant)/WA MRSA-88	1	1	2	CA

CC-5-MRSA-IV, Pediatric clone (PVL+)	0	2	2	CA
CC8-MRSA-IV(sea+), Lyon Clone/UK-EMRSA-2	5	4	9	CA
CC80-MRSA-IV, (PVL+), European CaMRSA Clone	1	0	1	CA
ST8-MRSA-IV (PVL+/ACME), ACME-negative Variant of USA300	0	1	1	CA
CC5-MRSAIV, Paediatric clone	1	0	1	CA
ST8-MRSA-IV (PVL+/ACME+), USA300	1	0	1	CA
CC6-MRSA IV, WA MRSA-51	0	2	2	CA
CC22-MRSA-IV (tst1+), UK-EMRSA-15/"Middle Eastern Variant"	1	3	4	CA
CC398-MRSA(truncated/atypical SCCmec)	1	0	1	LA
CC5-MRSAIV, paediatric clone(sed/i/r+)	2	0	2	CA
CC5, MRSA with atypical SCCmec element "Montreal strain I"	1	0	1	HA

ST8-MRSA-IV [PVL+/ACME+], USA300	0	1	1	CA
CC5-MRSA-IV, "Maltese Clone"	1	1	2	CA
CC88-MRSA-IV [PVL+]	0	1	1	CA
ST8-MRSA-IIA/B/D, Irish AR13/14	1	0	1	HA
ST72-MRSA-IV, USA700	0	1	1	CA
Gesamt	72	68	140	

Tabelle 26 Isolate der MRSA der Krankenhauspatienten, eingeteilt nach Anzahl der kolonisierten und invasiv befallenen Patienten mit HA-, CA- und LA-Zuordnung.

<i>SCCmec</i> -Typ	<i>SCCmec</i> -I	<i>SCCmec</i> -II	<i>SCCmec</i> -III	<i>SCCmec</i> -IV	<i>SCCmec</i> -V	Keine <i>SCCmec</i> -Zuordnung	Gesamt
Anzahl	1	77	1	48	3	10	140
Davon dem ST398 zuzuordnen:					3xCC398	Darunter 1xCC398 mit atypischer <i>SCCmec</i> und 1x CC398	

Tabelle 27: MRSA-Isolate der Krankenhauspatienten geordnet nach *SCCmec*-Typ und Anzahl an Isolaten mit der entsprechenden *SCCmec*, sowie Isolate die dem CC398 zugeordnet werden können.

4.10 Das Vorkommen von Virulenzfaktoren und wichtigen Genen zur Genotypisierung

4.10.1 Das *mecA*- und *nuc*-Gen

Das *mecA*-Gen der Methicillinresistenz, sowie das *S. aureus* spezifische *nuc*-Gen konnten bei allen 338 untersuchten Isolaten, als MRSA-spezifische Gene, nachgewiesen werden.

4.10.2 Das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL-Gen)

Das PVL-Gen wurde nur bei acht von 140 Krankenhauspatienten nachgewiesen (5,7 %) und zwei weitere Patienten isolate (1,4 %) waren zweifelhaft auf PVL getestet worden. Die Signifikanz über das Vorkommen des PVL-Gens unter den verschiedenen analysierten Gruppen ist hoch $p=0,024$.

	MRSA				Gesamt
	Krankenhauspatienten	Schweine	Schweine-assoziierte Menschen	Umgebung	
positiv	8	0	0	0	8
PVL- negativ	130	132	33	33	328
zweifelhaft	2	0	0	0	2
Gesamt	140	132	33	33	338

Tabelle 28: Vorkommen des PVL-Gens unter den analysierten Isolaten.

Die acht PVL-Gen-positiven Isolate von Krankenhauspatienten gehören mit einem kolonisierten Patienten zu dem CC88-MRSA-IV (CC80), zwei kolonisierten und einem invasiven Patienten zu dem ST8-MRSA-IV (CC8) und einem kolonisierten Patienten zu dem CC5-MRSA-V, alles CA-MRSA. Des Weiteren gehörte das Isolat eines kolonisierten Patientens zu dem CC5 und eines zu dem CC8 sowie das Isolat eines Invasiven zu dem CC5, ohne mögliche Zuordnung der *SCCmec*.

4.10.3 Das Gamma-Hämolysin (*hlg-Gen*)

Das Gamma-Hämolysin-Gen konnte bei 87,1 % der Patienten-, 82,6 % der Schweine-, 48,5 % der schweineassoziierten Menschen- und 57,6 % der Umgebungsprobenisolate nachgewiesen werden. Das Vorkommen dieses Virulenzfaktors ist signifikant mit $p < 0,001$.

					Gesamt
	Krankenhauspatient	Schweine	Schweine-assoziierte Menschen	Umgebung	
Gamma-Hämolysin-Gen positiv	122	109	16	19	266
negativ	13	14	8	8	43
zweifelhaft	5	9	9	6	29
Gesamt	140	132	33	33	338

Tabelle 29: Anwesenheit des gamma-Hämolysin-Gens unter den analysierten Isolaten.

Bei den 13 Gamma-Hämolysin-Gen-negativen Isolaten von Krankenhauspatienten handelte es sich um sechs CC22-MRSA-IV-Barnim-Stämme, zwei CC22-MRSA-IV (tst1+), einen CC45-MRSA-IV Berlin-Stamm, drei weitere CC22-Isolate und einen CC398, die nicht weiter zu differenzieren waren. Unter den 14 Gamma-Hämolysin-Gen negativen Schweineisolaten waren zwölf CC398-V und jeweils ein CC398-IV sowie ein CC398 mit atypischer *SCCmec* Kasette. Zu den acht Gamma-Hämolysin-Gen-negativen Isolaten von schweineassoziierten Menschen gehörten, sieben CC398-V und ein CC398 ohne mögliche *SCCmec*-Zuordnung. Außerdem waren unter den acht negativen Umgebungsisolaten vier CC398-V, ein CC398-IV, zwei atypische CC398 und ein CC398, ohne Möglichkeit einer näheren *SCCmec*-Zuweisung.

4.10.4 Das Gamma-Hämolysin, Alpha-Hämolysin, Beta-Hämolysin (Shingomyelase C) und Delta-Hämolysin (*hlg*-, *hla*-, *hly* und *hld*-Gen)

In fast allen untersuchten Gruppen wurden die alpha-, beta- und delta-Hämolysingene nachgewiesen. Nur das Beta-Hämolysin-Gen konnte bei keinem der MRSA-Isolate von Schweinen nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle stellt das Vorkommen der einzelnen Hämolysingene in jeder untersuchten Gruppe in Prozent dar.

	MRSA				Signifikanz
	Krankenhauspatienten	Schweine	Schweineassoziierte Menschen	Umgebung	
Alpha-Hämolysin-	84,2 %	90,9 %	69,7 %	78,8 %	p=0,018
Beta-Hämolysin-	80,0 %	0,0 %	6,1 %	6,1 %	p<0,001
Delta-Hämolysin-	100 %	100 %	97,0 %	97,0 %	p=0,041
Gen-positiv					
Gesamt n=	140	132	33	33	

Tabelle 30: Vorkommen der Alpha-, Beta- und Delta-Hämolysin-Gen-positiven-MRSA-Isolate in Prozent.

Alpha-Hämolysin-Gen-negative						Gesamt
Isolate		Kranken- hauspatient	Schwein	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	
	CC398	0	9	5	6	20
	CC45(- <i>agr-I</i>)	1	0	0	0	1
	CC5	11	0	0	0	11
	CC22	2	0	0	0	2
	CC8 (- ST239)	1	0	0	0	1
Gesamt		15	9	5	6	35

Tabelle 31: Alpha-Hämolysin-Gen-negative Isolate geordnet nach CC und Herkunft.

Beta-Hämolysin-Gen-negative						Gesamt
Isolate		Kranken- haus- patient	Schwein	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	
	CC398	4	132	31	31	198
	CC45 (<i>agr-I</i>)	2	0	0	0	2
	CC5	14	0	0	0	14
	CC22	1	0	0	0	1
Gesamt		21	132	31	31	215

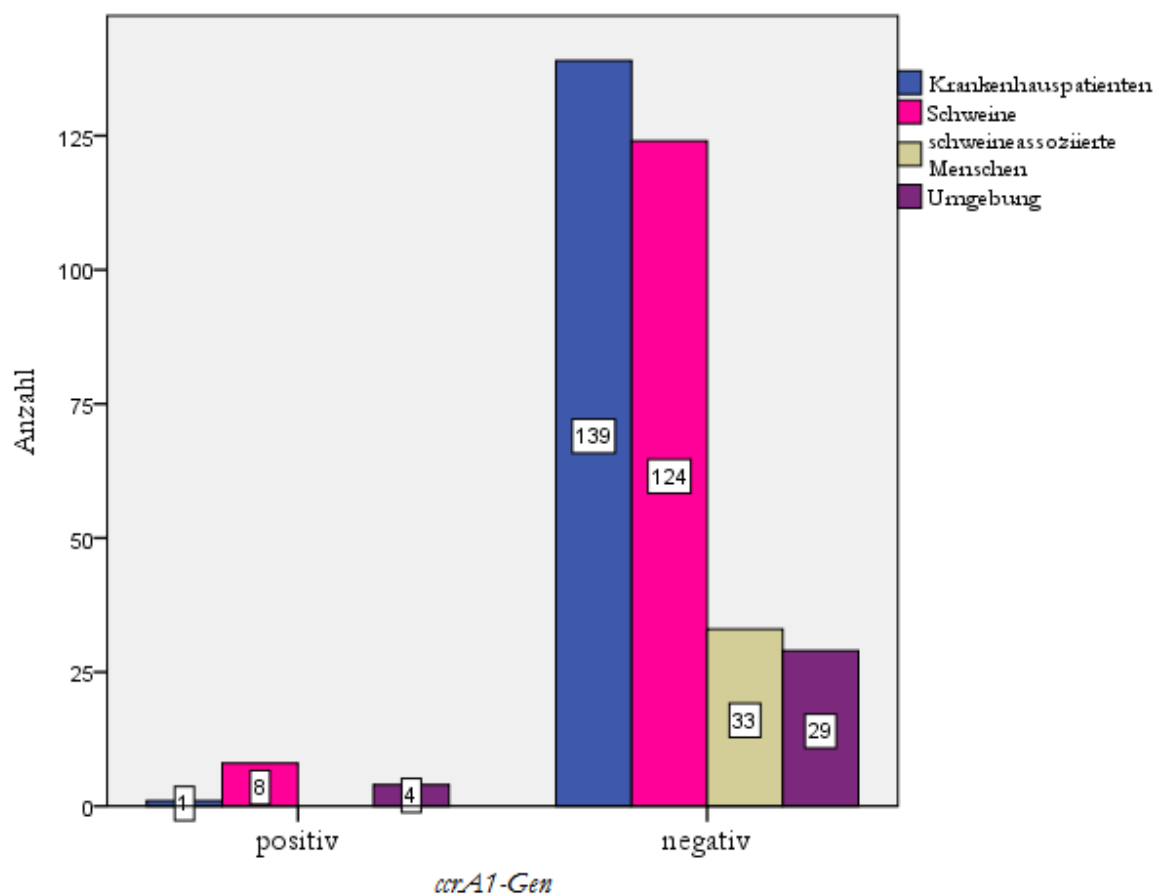
Tabelle 32: Beta-Hämolysin-Gen-negative Isolate geordnet nach CC und Herkunft.

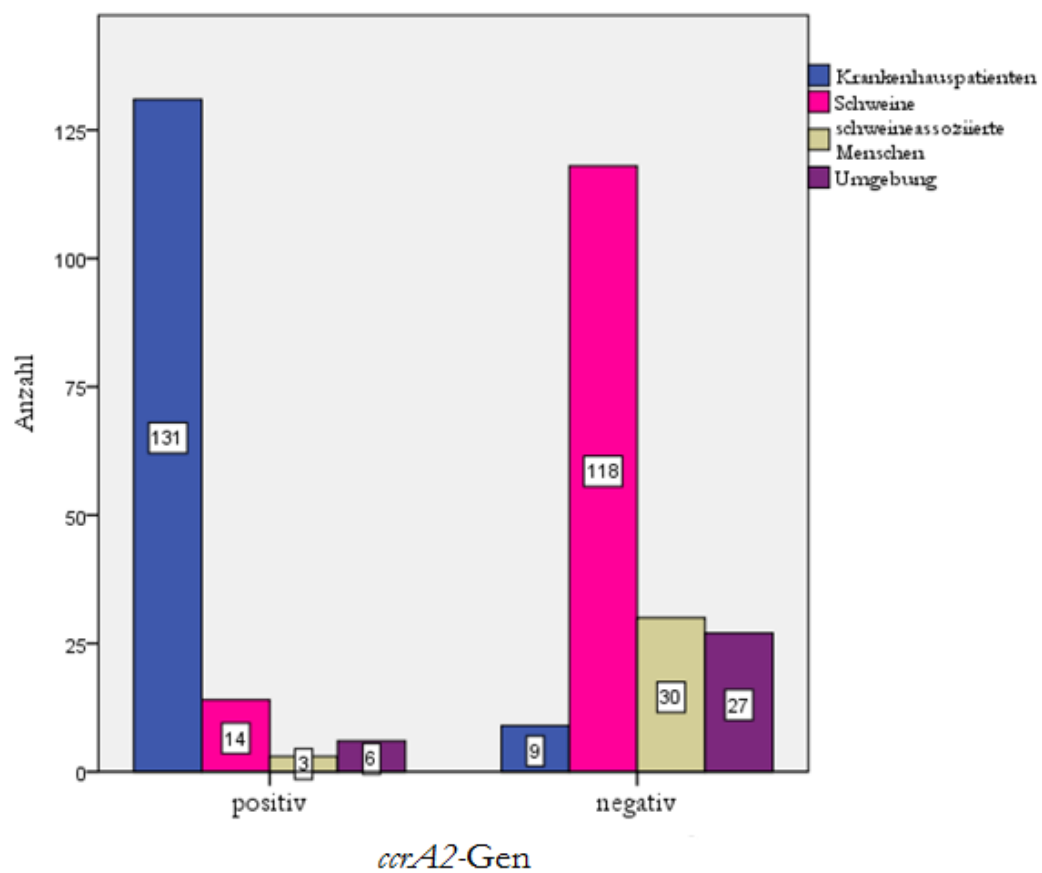
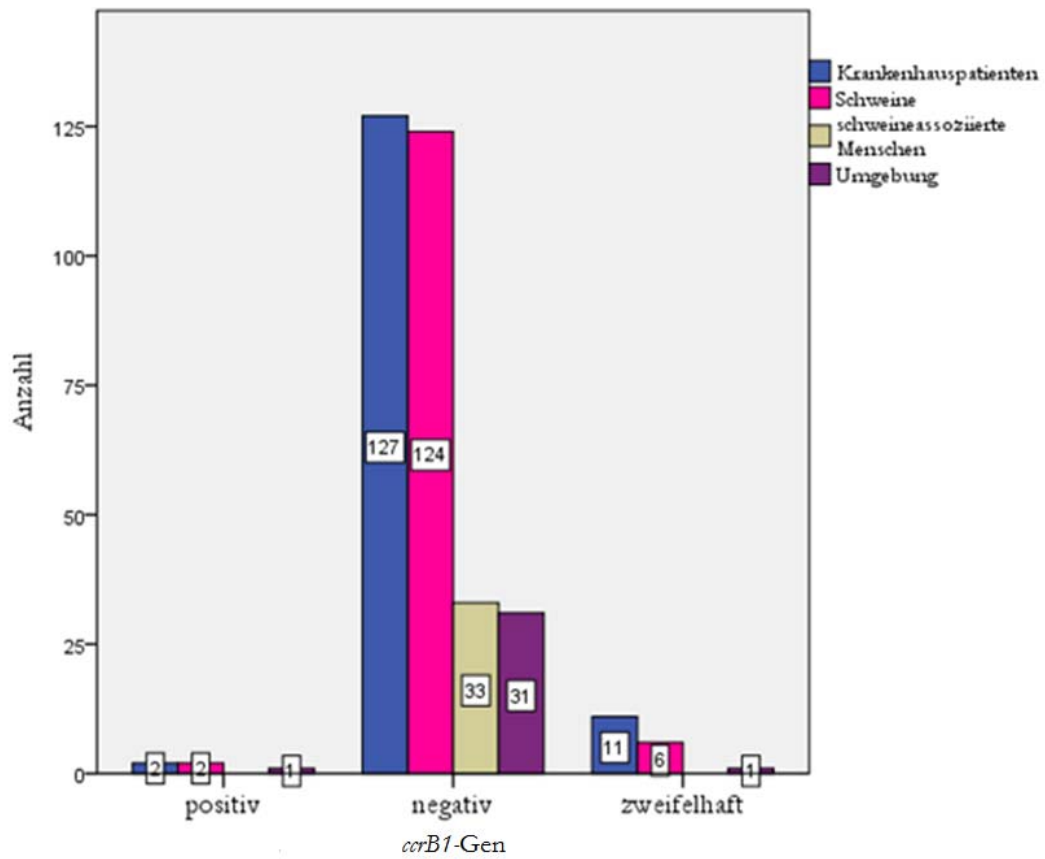
4.10.5 Die Cassetten Chromosom Recombinase Gene (*ccr*-Gene)

Das *ccr*-Gen A1 war bei 0,7 % der Patienten- ($n=1/140$) und 6,1 % der Schweineisolate ($n=8/132$) nachzuweisen. Das Auftreten war nicht signifikant mit $p=0,005$. Bei den Schweineisolaten wurde *ccrA1*-Gen bei drei Ferkeln und fünf Absetzern identifiziert. Darunter kamen fünf Mal der CC398-V vor und dreimal konnte der CC398, ohne mögliche *SCCmec*-Zuordnung, identifiziert werden. Auch bei zwei Sockentupfern und einer Staubprobe konnte der CC398-V und bei einem Sockentupfer der CC398 nachgewiesen werden ($n=4/33$, 12,1 %). Das

MRSA-Isolat eines Krankenhauspatienten mit dem *ccr-A1* Gen konnte dem ST-228-MRSA-I-Süddeutschland-Italien Klon zugeordnet werden.

Das *ccrB1*-Gen kam bei 1,4 % der Patienten (n=2/140) vor. Diese beiden Isolate gehörten dem ST5/ST225-MRSA-II-Rhein-Hessen-Stamm bzw. dem ST228-MRSA-I/ Süddeutschland-Italien Klon an. Die beiden positiven Ferkelisolate (1,5 %, n=2/132) gehörten wie auch der positive Sockentupfer (3,0 %, n=1/33) zu dem CC398. Das Vorkommen des *ccrB1*-Gens ist nicht signifikant mit $p=0,517$.





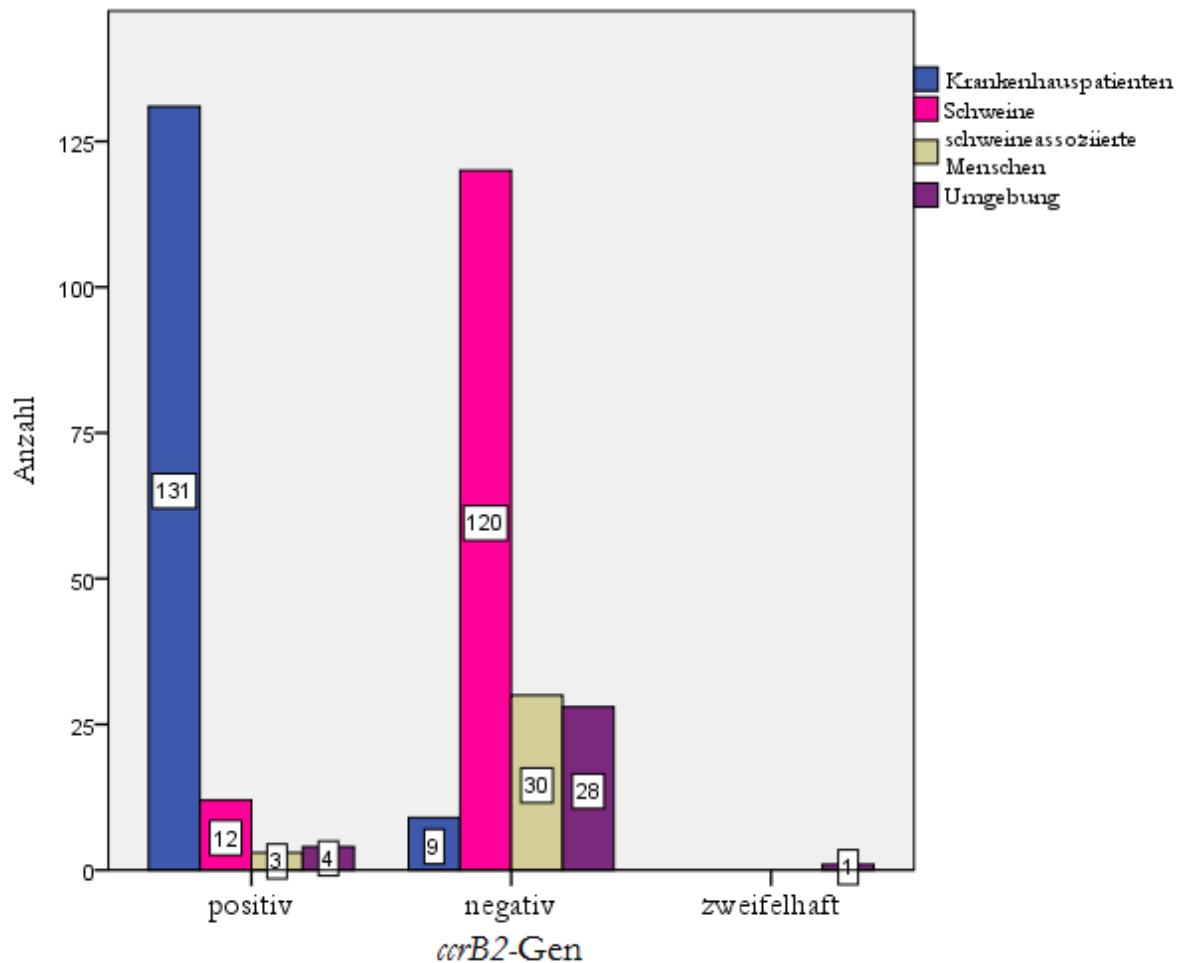


Abbildung 46: Anzahl der MRSA-Isolate mit dem *crb2*-Gen.

Das *crb2*-Gen war bei 93,6 % der Isolate von Krankenhauspatienten ($n=131/140$) nachweisbar und kam bei 10,6 % der Isolate von Schweinen ($n=14/134$) vor. Auch nur 9,1 % der Isolate von schweineassoziierten Personen ($n=3/33$) und 18,2 % der Umgebungsproben ($n=6/33$) wiesen dieses Gen auf.

Unter den 9 Isolate von Krankenhauspatienten ohne das *crb2*-Gen gehörten drei Isolate zu dem CC398-V, ein Isolat zu dem CC398, drei Isolate zu dem CC22, ein Isolat zu dem CC5/ST228-MRSA-I/Italienischer Klon und ein Isolat zu dem CC8/ST293-MRSA-III/Vienna/Hungarian/Brazilian Klon.

Auch das *crb2*-Gen kam bei 93,6 % der Patienten- ($n=131/140$) aber nur bei 9,7 % ($n=12/124$) der Schweine-, 9,1 % ($n=3/33$) der schweineassoziierten Menschenisolate und 12,1 % ($n=4/33$) der Isolate der Umgebungsproben vor. Das Vorkommen der *crb3*-, *crb4*-, *crb5*-, *crb6*- und *crb7*-Gene wurde in Tabelle 33 dargestellt. Dabei kam das *crb3*-Gen bei zwei Patientenisolaten

mit CC5 und einem Patientenisolat mit CC8 vor. Zwei positive Ferkelisolate gehörten dem CC398-V an und ein weiteres dem CC398. Das *ccrB3*-Gen konnte bei einem CC8/ ST293-MRSA-III, Vienna/Hungarian/Brazilian Clone nachgewiesen werden. Das *ccrC*-Gen kam am Häufigsten unter den Isolaten aus den Schweinebetrieben vor, da es mit dem ST398-V, der unter diesen Isolaten dominiert korreliert.

Das *ccrA4*-Gen konnte bei einem Studenten, mit CC398 und einer Staubprobe (jeweils n=1/33) mit einem atypischen CC398 nachgewiesen werden.

Das *ccrB4*-Gen wurde bei drei Patienten (n=3/140) mit CC22 gefunden, sowie bei einem Studenten mit CC398 und einer Staubprobe mit einem atypischen CC398.

	MRSA				P=
	Krankenhaus- patienten	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	
<i>ccrA3</i> -Gen- positiv	2,1 % (n=3/140)	2,3 % (n=3/132)	0,0 %	0,0 %	0,589
<i>ccrB3</i> -Gen- positiv	0,7 % (n=1/140)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,701
<i>ccrC</i> -Gen- positiv	7,1 % (n=7/140)	93,9 % (n=124/132)	93,9 % (n=31/33)	78,8 % (n=7/33)	<0,001
<i>ccrA4</i> -Gen- positiv	0,0 %	0,0 %	3,0 % (n=1/33)	3,0 % (n=1/33)	0,077
<i>ccrB4</i> Gen positiv	2,1 % (n=3/140)	0,0 %	3,0 % (n=1/33)	3,0 % (n=1/33)	0,321

Tabelle 33: Vorkommen der *ccrA3*-, *ccrB3*-, *ccrC*-, *ccrA4*- und *ccrB4*-Gene unter den analysierten Isolaten in Prozent.

	MRSA				Gesamt
	Krankenhaus- patienten	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	
CC398	4	124	31	26	185
CC5	2	0	0	0	2
CC22	3	0	0	0	3
CC8 (ST239)	1	0	0	0	1
Gesamt	10	124	31	26	191

Tabelle 34: CC der *ccrC*-Gen-positiven Isolate ($p < 0,001$).

	Krankenhaus- Patient	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	Zuordnung anhand des <i>SCCmec</i> -Typs und des <i>ccrC</i> -Typs (vorliegende Gene)
ST398-V	0,8 % n=1/126	88,9 % n=112/126	93,5 % n=29/31	80 % n=24/30	V; <i>ccrC</i>
ST398-IV	3,1 % n=3/126	7,1 % n=9/126	6,4 % n=2/31	16,7 % n=6/30	IV; <i>ccrA2+ccrB2</i>
CA- MRSA, <i>SCCmec</i> - IV, -V	35,9 % n=45/126	0 %	0 %	0 %	IV; <i>ccrA2+ccrB2</i> V; <i>ccrC</i>
HA- MRSA, <i>SCCmec</i> - I,-II,-III	61,1 % n=77/126	0 %	0 %	0 %	I; <i>ccrA1+ccrB1</i> II, III <i>ccrA2+ccrB2</i>

Tabelle 35: Die Verteilung der *SCCmec*-Kassetten mit zugehörigen *ccr*-Genen und die daraus resultierende Einordnung in CA-, HA- und LA-MRSA.

4.10.6 Die Accessory-Gen-Regulator-Gene (*agr*-Gen)

Das *agr*-I-Gen kam bei 32,1 % der Patienten- (n=45/140), 83,3 % der Schweine- (n=110/132), 42,4 % der schweineassoziierten Menschen- (n=14/33) und 54,5 % der Umgebungsprobenisolate (n=18/33) vor. Das Vorkommen des *agr*-I-Gens unter den Isolaten ist signifikant mit $p < 0,001$.

	<i>agr</i> -I			Gesamt
	positiv	negativ	zweifelhaft	
CC398	4	1	0	5
CC45 (<i>agr</i> -I)	1	0	1	2
CC5	0	88	0	88
CC22	19	0	0	19
CC1	0	3	0	3
CC8 (ST239)	1	0	0	1
CC8	15	0	0	15
CC80	1	1	0	2
CC6	2	0	0	2
CC80	0	1	0	1
CC8 (ST72)	1	0	0	1
CC97	1	0	0	1
Gesamt	45	94	1	140

Tabelle 36: Die CC der MRSA der Krankenhauspatienten mit dem *agr*-I-Gen.

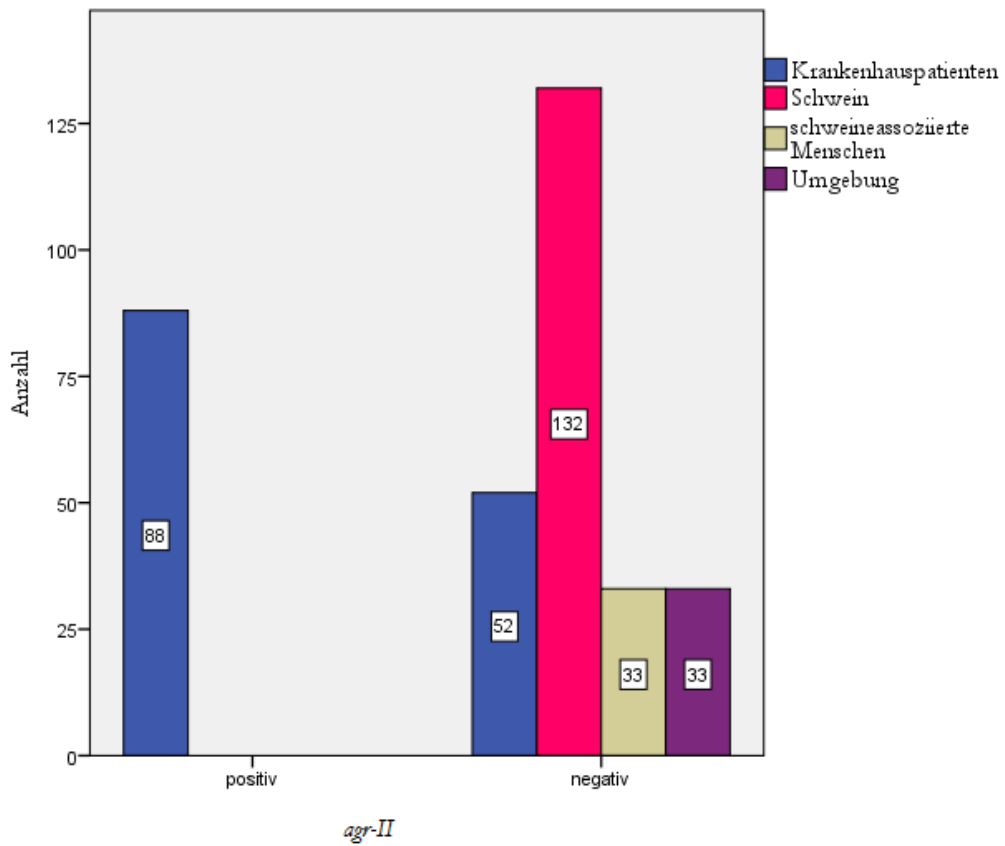
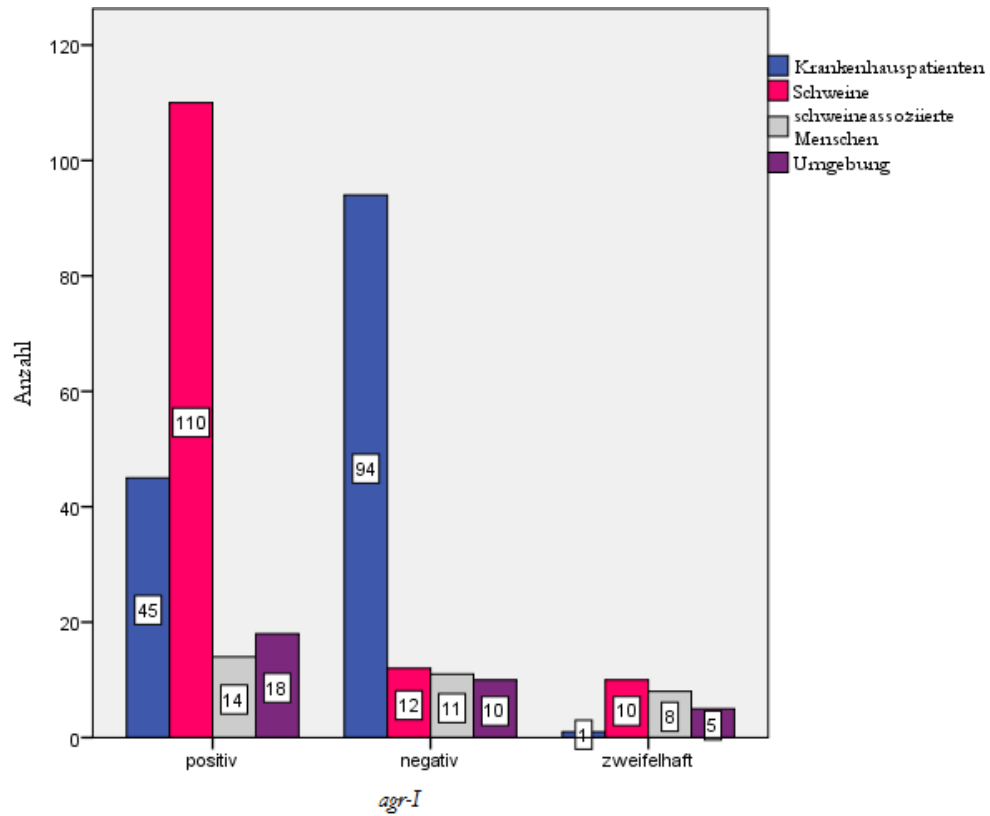
Das *agr*-II-Gen konnte bei 88 von 140 Krankenhauspatientenisolaten (62,9 %) nachgewiesen werden. Das Vorkommen des *agr*-II-Gens ist signifikant mit $p < 0,001$. Alle positiven 88 Isolate gehörten den CC5 an mit den ST und *SCC_{mec}*, die in der Tabelle 37 dargestellt werden.

	Patienten mit MRSA		Gesamt
	Patient infiziert	Patient kolonisiert	
ST5/ST225-MRSAII, UK-EMRSA-3/Rhine-Hesse EMRSA	42	34	76
ST228-MRSA-i, South German EMRSA/ Italian Clone	1	0	1
CC-5-MRSA-IV, Pediatric clone (PVL+)	0	2	2
CC5-MRSAIV, Paediatric clone	1	0	1
CC5MRSAIV, Paediatric clone(sed/j/r+)	2	0	2
CC5, MRSA with atypical <i>SCCmec</i> element "Montreal strain I"	1	0	1
CC5-MRSA-IV, "Maltese Clone"	1	1	2
Eine Zuordnung zu einer <i>SCCmec</i> war nicht möglich, obwohl der CC erkannt wurde	1	2	3
Gesamt	49	39	88

Tabelle 37: Isolate des CC5 mit dem *agr*-II-Gen der MRSA von Krankenhauspatienten.

Das *agr*-III-Gen war nur bei 5 von 140 Krankenhauspatienten (3,6 %) vorhanden und war bei keinem Isolat eines Schweines, schweineassoziierten Menschen und keiner Umgebungsprobe nachweisbar. Die fünf positiven Patientenisolat gehörten mit drei Isolaten zu dem CC1-MRSA-IV, mit einem Isolat zu dem CC88-MRSA-IV (PVL+) und mit einem Isolat zu dem CC80-MRSA-IV(PVL+)/ European CA-MRSA Klon. Das Vorkommen des *agr*-II-Gens ist nicht signifikant ($p=0,066$).

Das *agr*-IV-Gen konnte bei keinem der untersuchten Isolate nachgewiesen werden.



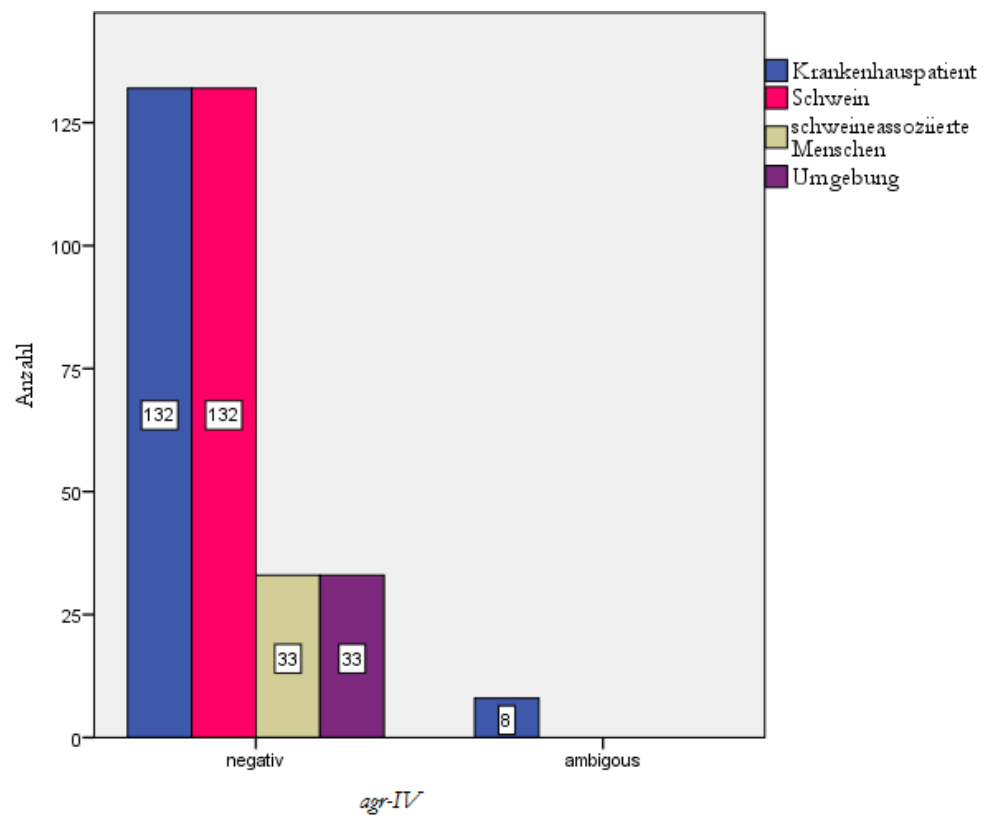
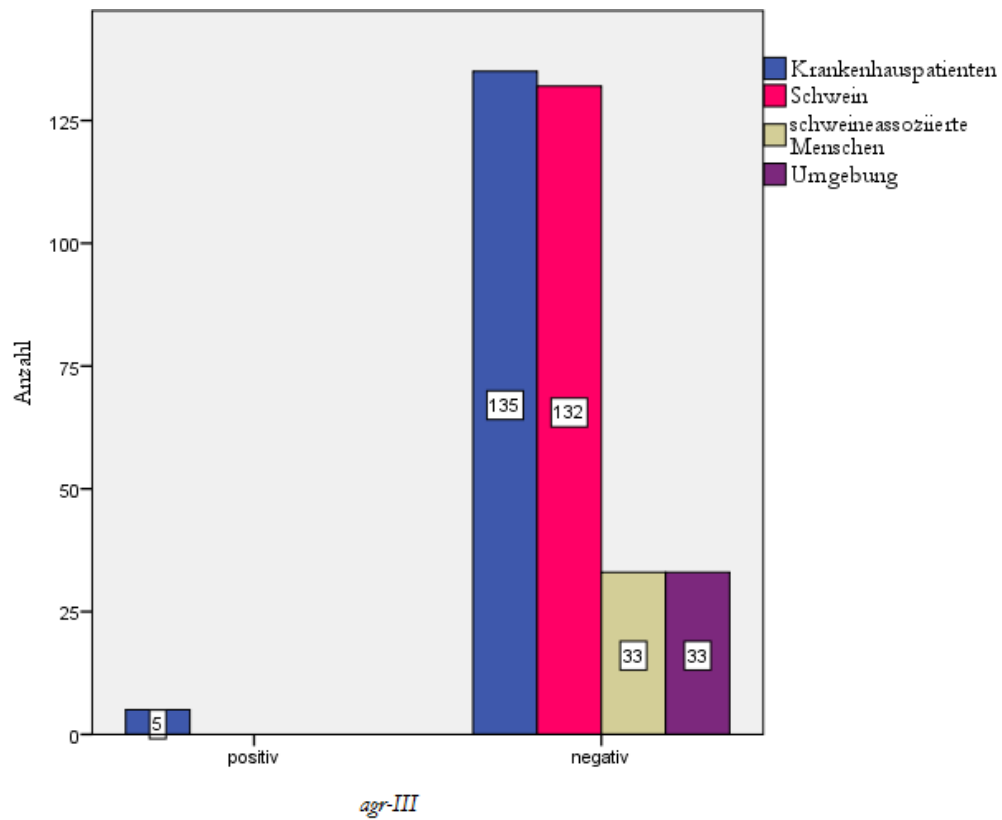


Abbildung 47: Das Vorkommen der *agr*-I–IV-Gene unter den untersuchten Gruppen.

4.10.7 Das Collagen-binding Adhesin (*cna*-Gen)

Das Collagen-binding Adhesin-Gen, zur Anheftung an Kollagen, konnte bei allen Isolatn von Schweinen, schweineassoziierten Menschen und Umgebungsproben nachgewiesen werden. Es kam allerdings nur bei 25,7 % der Isolate von Krankenhauspatienten (n=36/140) vor. Das *cna*-Gen-Vorkommen ist signifikant mit $p < 0,001$.

		MRSA				Gesamt
		Krankenhaus- patienten	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	
Collagen-binding adhesin-Gen	positiv	36	132	33	33	234
	negativ	103	0	0	0	103
	zweifelhaft	1	0	0	0	1
Gesamt		140	132	33	33	338

Tabelle 38: Das Vorkommen des Collagen-binding Adhesin-Gens bei den MRSA der untersuchten Gruppen.

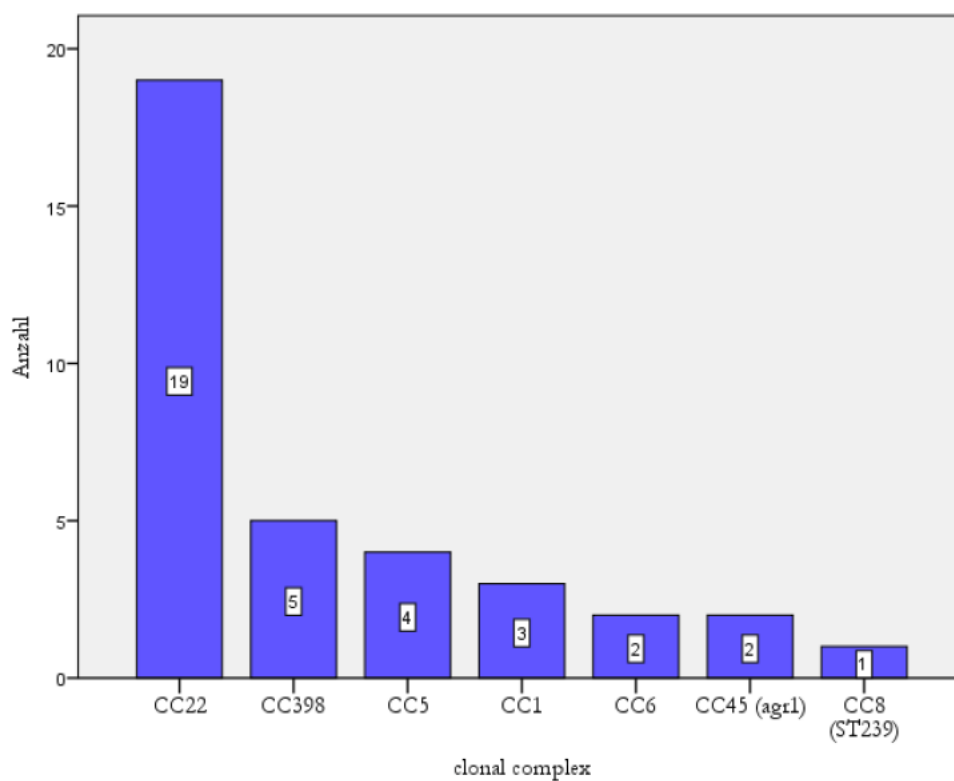


Abbildung 48: Die CC der *cna*-Gen-positiven MRSA-Isolate der Krankenhauspatienten.

	Collagen-binding adhesin-Gen			Gesamt
	positiv	negativ	zweifelhaft	
CC398	5	0	0	5
CC45 (<i>agr-I</i>)	2	0	0	2
CC5	4	84	0	88
CC22	19	0	0	19
CC1	3	0	0	3
CC8 (ST239)	1	0	0	1
CC8	0	14	1	15
CC80	0	2	0	2
CC6	2	0	0	2
CC80	0	1	0	1
CC8 (ST72)	0	1	0	1
CC97	0	1	0	1
Gesamt	36	103	1	140

Tabelle 39: Anzahl der *cna*-Gen-positiven und -negativen Isolate von Krankenhauspatienten geordnet nach CC.

4.10.8 Potassium-translocating ATPase A und B (*kdpA*-, *kdpB*-Gen)

Sowohl die Potassium-translocating ATPase A- als auch B-Gene konnte nur bei den MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten des Universitätsklinikums Heidelberg nachgewiesen werden. Das ATPase-A-Gen wurde bei 57,9 % (n=81/140) und das ATPase B-Gen bei 50,7 % (n=71/140) der Patienten nachgewiesen. Die positiven Patienten gehörten alle dem CC5 an. Von dem ATPase A-Gen-positiven Isolaten gehörten 93,8 % (n=76/81) zu dem ST5/ST225-MRSA-II/ Rhine-Hessen-Stamm, 2,5 % (n=2/81) zu dem „Montreal strain I“ und 1,2 % (n=1/81) zu dem CC5 mit atypischer *SCCmec*-Kassette. Dem CC5 ohne *SCCmec*-Zuordnung konnten weitere 2,5 % (n=2/81) zugeordnet werden.

Die Potassium-transporting ATPase-B-Gen-positiven Patienten gehörten auch alle dem CC5 an. Davon gehörten 95,8 % dem ST5/ST225-MRSA-II-Rhine-Hessen (n=68/71) an, 1,4 % (n=1/71) dem CC5-MRSA-IV-paediatic clone(sed/j/r+) und 2,8 % (n=2/71) konnten nur dem CC5 zugeordnet werden. Das Vorkommen der Potassium-transporting ATPase A- und B-Gene ist signifikant (p=0,016).

		MRSA				Gesamt
		Krankenhaus- patienten	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umge- bung	
Potassium- translocating A-Gen	positiv	81	0	0	0	81
	negativ	59	132	33	33	257
Gesamt		140	132	33	33	338

Tabelle 40: Vorkommen des Potassium-transporting ATPase A-Gens.

		MRSA				Ge- samt
		Krankenhaus- patienten	Schwein	Schweine- assoziierte Menschen	Umge- bung	
Potassium- transporting B-Gens	positiv	71	0	0	0	71
	negativ	66	132	33	33	264
	Zweifel- haft	3	0	0	0	3
Gesamt		140	132	33	33	338

Tabelle 41: Vorkommen des Potassium-transporting ATPase B-Gens.

.

4.10.9 Leukocidin D und E (*lukD*- und *lukE*-Gen)

Das Leukozidin D-Gen konnte bei 81,4 % der Krankenhauspatienten- (n=114/140) und nur 3,0 % (jeweils n=1/33) der schweineassoziierten Menschen- und Umgebungsprobenisolate nachgewiesen werden. Das positive Umgebungsisolat gehörte zu einem atypischen CC398 und auch das MRSA-Isolat eines Tiermedizinstudenten zu dem CC398. Die positiven Patientenisolate gehörten den CC5 (62,9 %, n=88/140), CC8 (13,2 %), CC1 (2,6 %), CC8 (ST239) (0,9 %), CC80 (1,8 %), CC6 (1,8 %) sowie CC80 (0,9 %), CC8 (ST72) (0,9 %) und CC97 (0,9 %) an.

Das Leukozidin E-Gen konnte bei 80,7 % der Patienten (n=113/140) aber keinem MRSA-Isolat aus Schweinebeständen nachgewiesen werden.

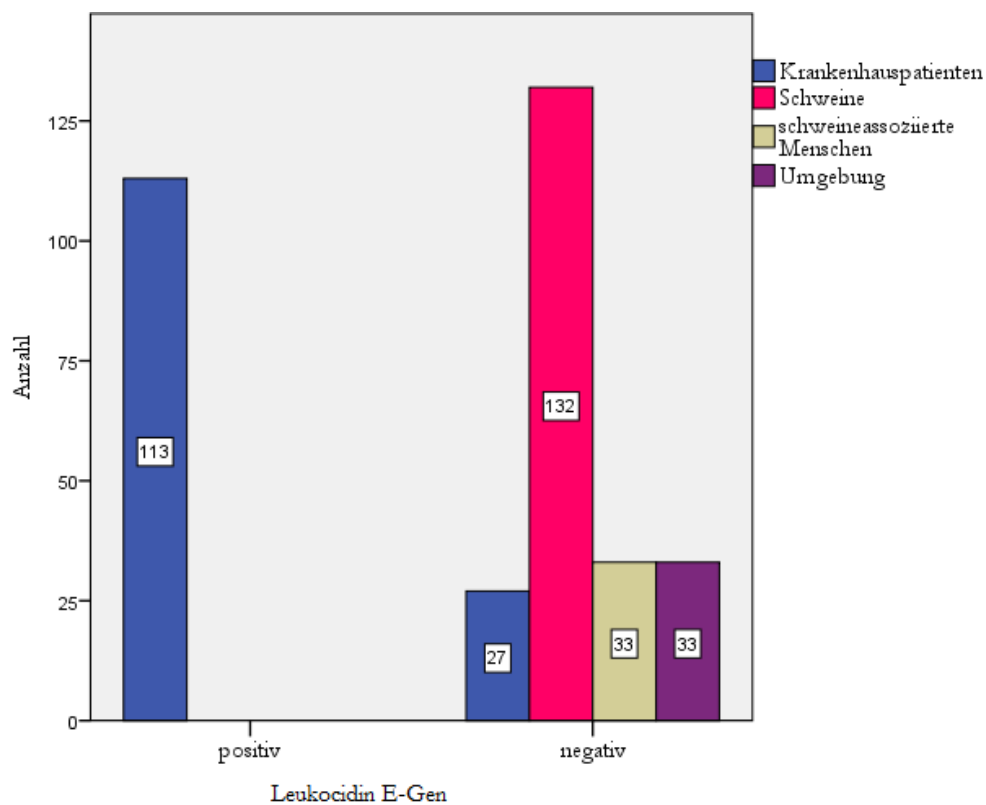
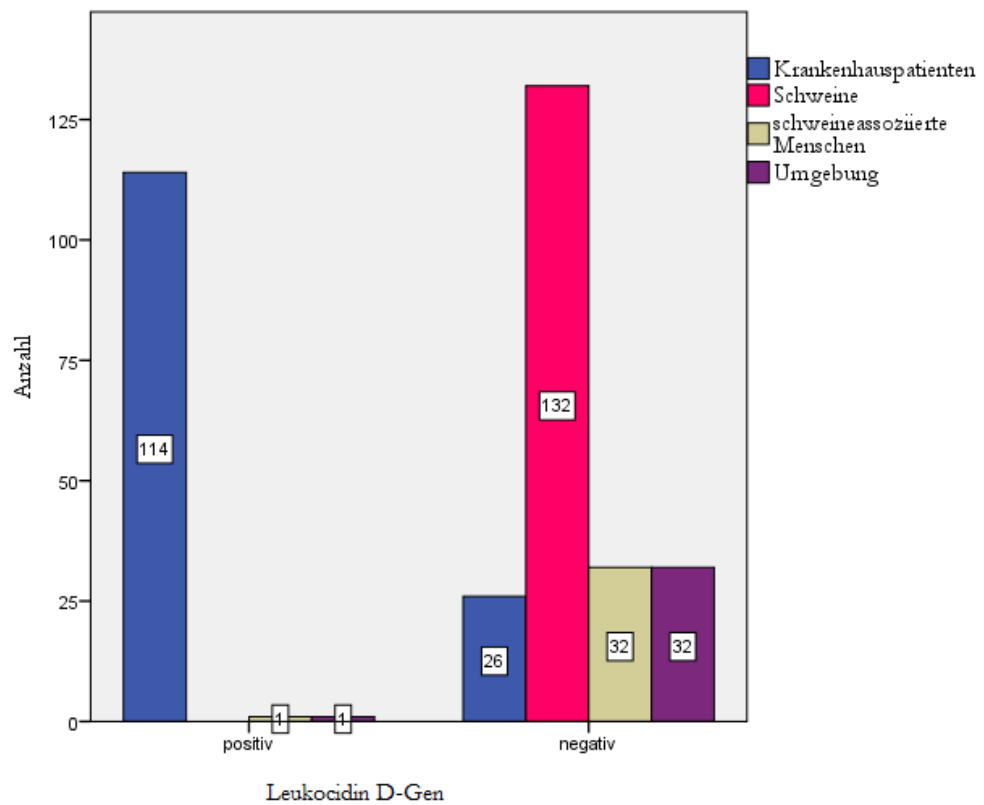


Abbildung 49: Das Leukozidin D- und E-Gen Vorkommen bei den MRSA der untersuchten Gruppen ($p < 0,001$).

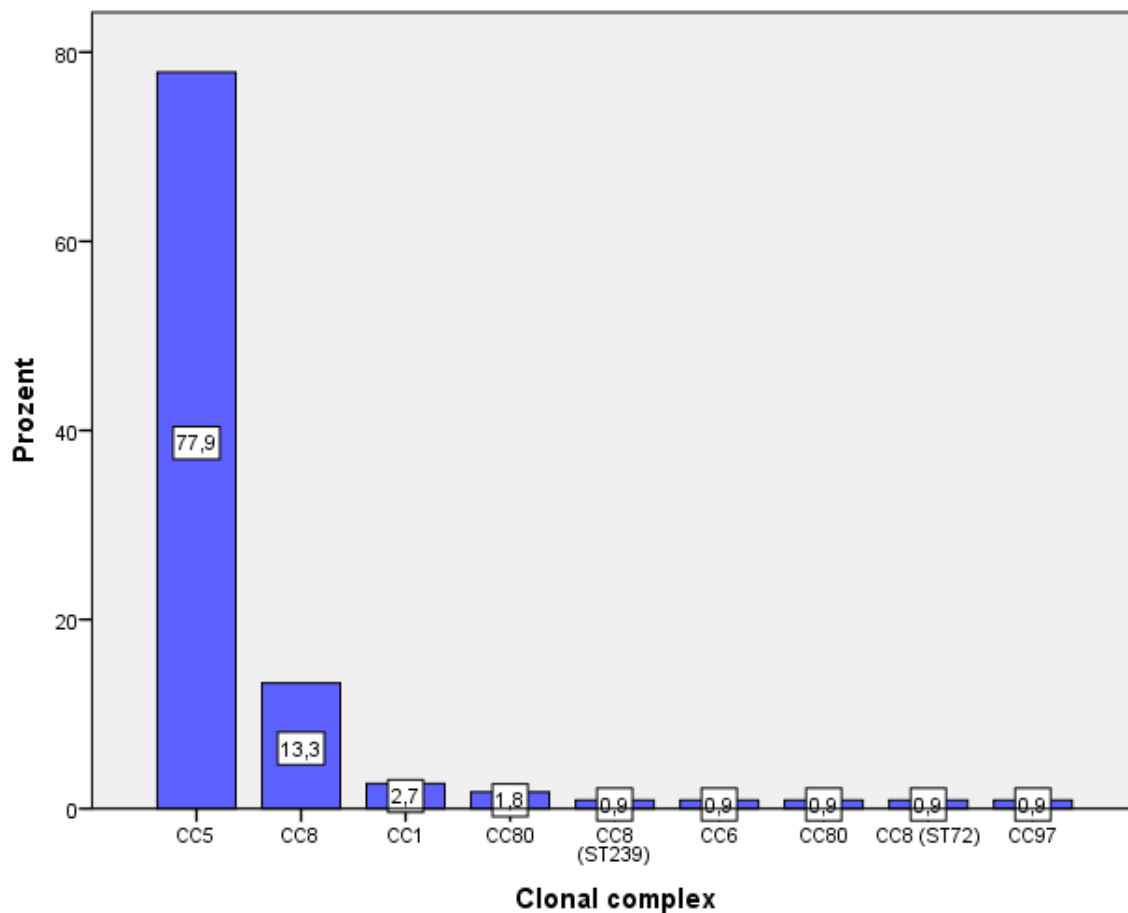


Abbildung 50: ST der Leukocidin E-Gen positiven Krankenhauspatienten.

4.10.10 Die Staphylokinase (*sak*-Gen), das Chemotaxis-inhibiting Protein (*chp*-Gen) und der Staphylococcal Complement Inhibitor (*scn*-Gen)

Die Gene der Staphylokinase und des Chemotaxis-inhibiting Proteins konnten nur bei den Krankenhauspatienten nachgewiesen werden. Das Staphylococcal Complement Inhibitor-Gen kam bei 83,6 % der Patienten (n=117/140) und bei jeweils einer Staubprobe und einem Studenten (jeweils n=1/33) vor. Die Ergebnisse des Vorkommens aller drei Virulenzfaktoren, die zum Immune-Evasions Cluster (IEC) gehören, sind signifikant mit $p < 0,001$.

Positiver Nachweis	Krankenhauspatienten	Schweine	Schweineassoziierte Menschen	Umgebung
Staphylokinase-gen	92,1 % (n=129/140)	0 %	0 %	0 %
Chemotaxis-inhibiting Protein-Gen	74,3 % (n=104/140)	0 %	0 %	0 %
Staphylococcal Complement Inhibitor-Gen	83,6 % (n=117/140)	0 %	3,0 % (n=1/33)	3,0 % (n=1/33)

Tabelle 42: Vorkommen der Gene des Immune-Evasion-Clusters.

4.10.11 Protein A (*spa*-Gen)

Das Protein A wurde bei allen analysierten MRSA-Isolaten, als *S. aureus* spezifisches Gen, nachgewiesen.

4.10.12 Das Fibrinogenbindungs-Protein (*fib*-Gen mit 19kDa)

Das Fibrinogenbindungs-Protein-Gen (*fib*-Gen) konnte bei 81,4 % der Krankenhauspatientenisolat (n=114/140) jedoch keinem Schweine-, keinem schweineassoziierten Menschen- und keinem Umgebungsprobenisolat nachgewiesen werden. Das Vorkommen ist signifikant ($p < 0,001$). Das *fib*-Gen konnte unter den Krankenhauspatienten bei 88 CC5 (77,2 %), drei CC1 (2,6 %), einem CC8 mit ST239 (0,9 %), 15 CC8 (13,2 %), zwei CC6 (1,8 %), einem CC80 (0,9 %), einem CC8 (ST72) (0,9 %) und einem CC97 (0,9 %) nachgewiesen werden. Es fehlte komplett bei den CC398, CC45 (*agr*-I), CC5 und dem CC22, der Isolate von Krankenhauspatienten.

		MRSA				Gesamt
		Krankenhauspatienten	Schweine	Schweine-assoziierte Menschen	Umgebung	
Fibrinogenbin-	positiv	114	0	0	0	114
dungs Protein-Gen	negativ	26	132	33	33	224
Gesamt		140	132	33	33	338

Tabelle 43: Vorkommen des Fibrinogenbindungs-Protein-Gen.

4.10.13 Fibronectinbindendes Protein (*fnb*-Gen)

Das Fibronectinbindende Protein-A-Gen konnte bei allen Isolaten von Krankenhauspatienten (n=140/140) und bei 93,9 % der Schweine (n=124/132), 69,7 % der schweineassoziierten Menschen (n=23/33) und 69,7 % der Umgebungsproben (n=23/33) nachgewiesen werden. Das Fibrinogen-bindende Protein-B-Gen kam bei 85 % der Isolate von Patienten, 98,5 % der Schweine, 97 % der schweineassoziierten Menschen und 90,9 % der Umgebungsproben vor. Alle positiven schweineassoziierten Isolate gehörten dem CC398 an.

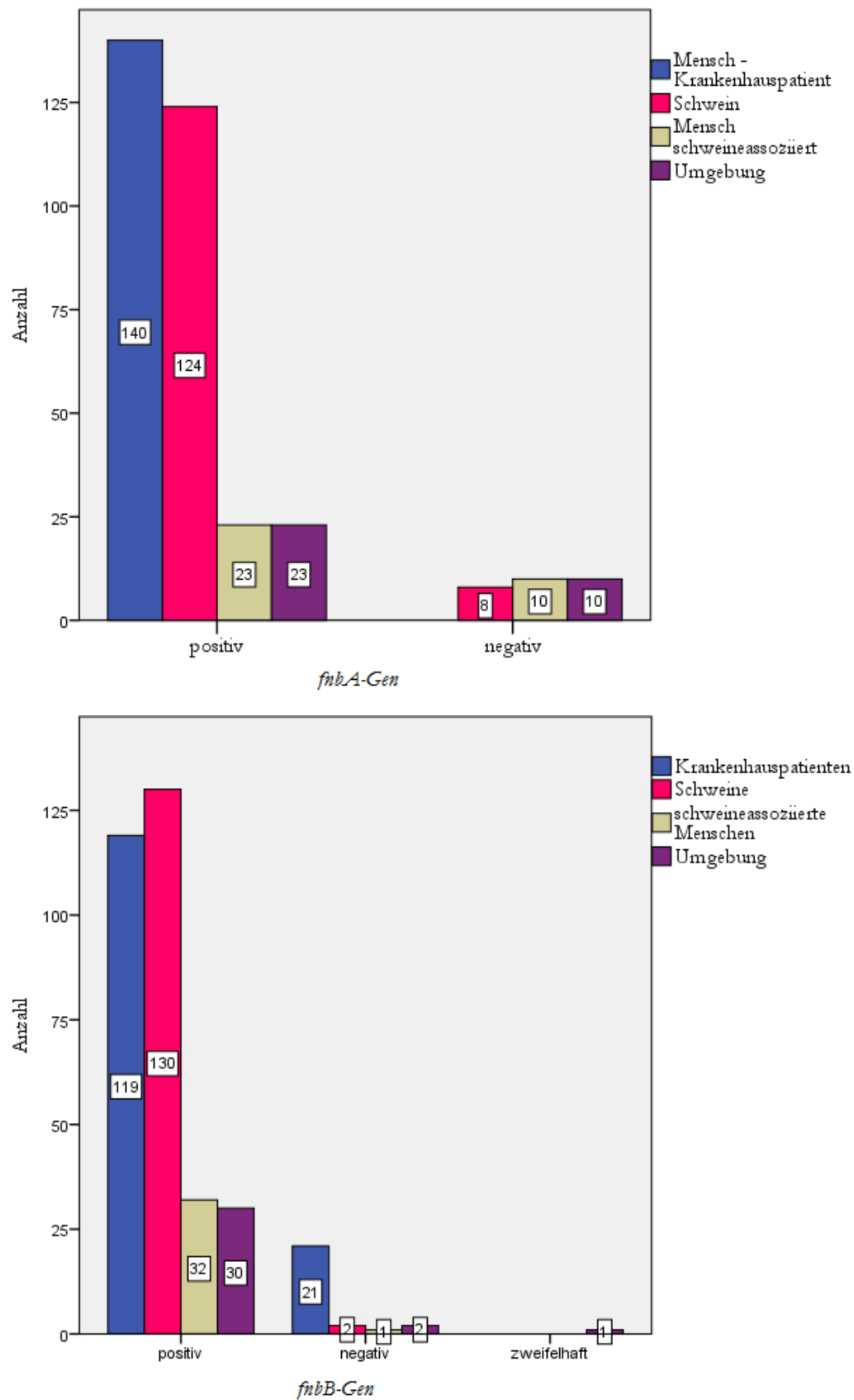


Abbildung 51: Vorkommen des Fibrinogen bindenden Protein-A und -B-Gens ($p < 0,001$).

4.10.14 Das *Staphylococcus aureus* Oberflächenprotein G (*sasG*-Gen)

Das Gen des *S. aureus* Oberflächenproteins G trat bei 95,7 % der Isolate von Patienten auf (n=134/140), jedoch nur bei 15,2 % der Isolate von Schweinen (n=20/132), 3 % der schweineassoziierten Menschen- (n=1/33) und 6,1 % der Umgebungsprobenisolate (n=2/33). Die beiden positiven Umgebungsisolate gehörten zu dem CC398-V und einem CC398 mit atypischer *SCCmec*. Das eine positive Studentenisolat gehörte zum CC398 und 14 Schweineisolate zu dem CC398-V, sowie weitere vier Schweine zu dem CC398-IV und zwei Schweine zu dem CC398 ohne mögliche *SCCmec*-Zuordnung.

		MRSA				Gesamt
		Krankenhaus- patienten	Schweine	Schweine- assoziierte Menschen	Umgebung	
<i>sasG</i> -Gen	positiv	134	20	1	2	157
	negativ	6	112	32	31	181
Gesamt		140	132	33	33	338

Tabelle 44: Vorkommen des *sasG*-Gens ($p < 0,001$).

	<i>sasG-Gen</i>		Gesamt
	positiv	negativ	
CC398	1	4	5
CC45 (<i>agr-I</i>)	0	2	2
CC5	88	0	88
CC22	19	0	19
CC1	3	0	3
CC8 (ST239)	1	0	1
CC8	15	0	15
CC80	2	0	2
CC6	2	0	2
CC80	1	0	1
CC8 (ST72)	1	0	1
CC97	1	0	1
Gesamt	134	6	140

Tabelle 45: *SasG-Gen*-positive und -negative CC der Krankenhauspatienten.

4.10.15 Clumping-Faktor und Kapsel (*clf*- und *cna*-Gen)

Das Clumping Faktor A- und B-Gen war bei allen untersuchten Isolaten nachzuweisen. Außerdem konnte unter allen schweineassoziierten Isolaten das Kapseltyp-5-Gen nachgewiesen werden. Unter den Krankenhauspatienten gehörten auch 92,1 % der Isolate (n=129/140) dem Kapseltyp-5 an und nur 7,9 % der Isolate (n=11/140) dem Kapseltyp-8.

4.10.16 Die Enterotoxine (*sea-sej*-Gene)

In der Tabelle 46 wurde das Vorkommen aller Enterotoxingene dargestellt. Dabei kamen insgesamt bemessen bei den Krankenhauspatienten außer die Enterotoxingene *sea320* und *sef* alle getesteten Enterotoxingene vor. Bei den schweineassoziierten MRSA-Isolaten konnten nur die *sea*-, *sea320*-, *sed*-, *sef*-, *seg*- sowie *sej*-Enterotoxingene nachgewiesen werden.

Enterotoxin- gene	Positive Patienten in %	Positive Schweine in %	Positive schweineassoziierte Menschen in %	Positive Umgebungsproben in %	Signifikanz P=
<i>sea</i>	9,3	0,76	0	0	0,001
<i>sea320</i>	0	2,3	9,1	6,1	0,042
<i>sea</i> N315= <i>entP</i>	52,1	0	0	0	<0,001
<i>seb</i>	0,7	0	0	0	0,739
<i>sec</i>	8,6	0	0	0	0,001
<i>sed</i>	57,1	10,6	3	6,1	<0,001
<i>sef</i> =Enterotoxin- gen E	0	0	3	3	0,040
<i>seg</i>	79,3	2,5	6,1	3	<0,001
<i>seh</i>	2,1	0	0	0	0,233
<i>sei</i>	0,8	0	0	0	<0,001
<i>sej</i>	55,7	1,5	0	0	0,000
<i>sek</i>	3,6	0	0	0	0,066
<i>sel</i>	7,9	0	0	0	0,007
Enterotoxin- like Protein M- Gen	79,3	0	0	0	<0,001
Enterotoxin-like Protein O-Gen	78,6 72,9	0 0	0 0	0 0	<0,001 <0,001
<i>seq</i>	3,6	0	0	0	0,066
<i>ser</i>	47,1	0	0	0	<0,001
Enterotoxin-like protein U-Gen	78,6	0	0	0	<0,001
Gesamt n=	140	132	33	33	

Tabelle 46: Vorkommen der Enterotoxingene (in Prozent), bei den MRSA-Isolaten der untersuchten Gruppen.

4.10.17 Das Toxik Schock Syndrom Toxin-1 (*tst1*-Gen)

Das Toxik Schock Syndrom Toxin-1-Gen konnte nur bei MRSA-Isolaten von sechs Krankenhauspatienten (n=6/140, 4,3 %) und einem Schwein nachgewiesen werden. Die Krankenhauspatienten gehörten mit vier Isolaten dem CC22-MRSA-IV (*tst1*+/"Middle Eastern Variant" und mit zwei Isolaten dem CC5 an. Das Schweineisolat war dem CC398-V zuzuordnen. Das Vorkommen ist nicht signifikant (p=0,116).

4.10.18 Die Staphylococcal Superantigen-like Proteine 1-11 (*ssl1-11*-Gen)

Die Staphylococcal-Superantigene like Proteingene 1-11 kamen insgesamt bemessen bei allen MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten vor. Im Gegensatz dazu konnten bei den Isolaten aus den Schweinebetrieben nur die Gene *ssl1*, *ssl3*, *ssl5* und *ssl10* nachgewiesen werden. Bei einem ST398 Isolat eines invasiv befallenen Patienten kam noch das *ssl9*-Gen vor, während die anderen vier Isolate von Patienten nur die Gene *ssl1*, -3, -5 und -10 aufwiesen. Das Vorkommen der *ssl1-11*-Gene ist signifikant (p<0,001).

Gene der Staphylococcal superantigen like Protein-Gene	Positive Patienten in %	Positive Schweine in %	Schweineassoziierte Menschen in %	Positive Umgebungsproben in %
<i>ss/1</i>	80	100	97	97
<i>ss/2</i>	83,6	0	0	0
<i>ss/3</i>	84,3	0,8	3	3
<i>ss/4</i>	80	0	0	0
<i>ss/5</i>	94,3	0,8	0	0
<i>ss/6</i>	17,9	0	0	0
<i>ss/7</i>	79,3	0	0	0
<i>ss/8</i>	81,4	0	0	0
<i>ss/9</i>	80,7	0	0	0
<i>ss/10</i>	92,9	33,3	21,2	33,3
<i>ss/11</i>	12,9	0	0	0
Gesamt n= (absolute Zahlen)	140	132	33	33

Tabelle 47: Vorkommen der Staphylococcal-like Superantigen-Gene in Isolaten jeder untersuchten Gruppe (Vorkommen jedes Superantigens: $p < 0,001$).

4.10.19 MRSA des CC398 der Krankenhauspatienten

Die folgende Tabelle 48 stellt die fünf Isolate des CC398 der Krankenhauspatienten dar, unter denen auffällig ist, dass ein Isolat eines kolonisierten Patienten Träger des *sak*-, *chp*- und *scn*- Gens ist und auch bei einem invasiven Patientenisolat konnten diese Gene nachgewiesen werden, genauso wie das beta-Hämolysin-Gen, das *ss/9*-Gen und das *cap-1*-Gen.

Krankenhauspatienten des CC398	Kolonisiert-1	Invasiv-1	Kolonisiert-2	Kolonisiert-3	Invasiv-2
<i>SCCmec</i>	V	V	V	keine Zuordnung möglich	atypische SCCmec
<i>PVL-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
<i>agr-I-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv
<i>mecA-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>ccrA2- +ccrB2-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>ccrC-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
<i>hla-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>hlyB-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>hlyG-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>hlyD-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>sak-Gen</i>	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>chp-Gen</i>	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>scn-Gen</i>	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>ssl-1-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
<i>ssl-3-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>ssl-5-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>ssl-9-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>ssl-10-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>cap-8-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
<i>cap-5-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
<i>clfA- und B-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>cna-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>fmbA-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
<i>fmbB-Gen</i>	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
<i>sasG-Gen</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv

Tabelle 48: Nachgewiesene Virulenzgene der fünf Isolate des CC398 von Krankenhauspatienten.

Die blau markierten Ergebnisse, weichen in ihrem Vorkommen von den Ergebnissen der CC398 von Schweinen, schweineassoziierten Menschen und Umgebungsproben ab.

4.11 Die genotypisierten MSSA-Isolate

Neben den MRSA-Isolaten wurden noch 7 MSSA-Isolate genotypisiert. Die Isolate stammten von vier Landwirten, zwei Studenten und einer Sau. Das Vorkommen der unterschiedlichen CC bei den untersuchten Gruppen ist nicht signifikant ($p=0,068$). Alle nachgewiesenen Virulenzfaktoren der MSSA wurden in der Tabelle 49 dargestellt. Besonders auffällig ist, dass das ST211-MSSA Isolat einer Sau Träger des PVL-Gens war.

	Isolatherkunft			Gesamt
	Schweine- bauer	Student	Sau	
CC45-MSSA	2	0	0	2
CC398-MSSA	2	2	0	4
ST211-MSSA	0	0	1	1
Gesamt	4	2	1	7

Tabelle 49: CC der MSSA-Isolate.

Isolate	CC45-MSSA	CC398	ST211-MSSA
Vorkommen	2 Landwirte	2 Landwirte und 2 Studenten	Eine Sau
<i>PVL-Gen</i>			+
<i>agrI-Gen</i>		+ 2 (Landwirte)	
<i>tstI-Gen</i>		+ (2 Studenten)	+
<i>entA-Gen</i>		+ (2 Studenten)	
<i>entB-Gen</i>			+
<i>entG-Gen</i>	+	+ (2 Studenten)	
<i>entL-Gen</i>		+ (2 Studenten)	
<i>entJ-Gen</i>	+		
<i>selm-Gen</i>	+		
<i>hlg-Gen</i>	+	+2 (Landwirte)	+
<i>hla-Gen</i>		+ (2 Landwirte)	+
<i>sak-Gen</i>	+	+ (2 Studenten)	
<i>chp-Gen</i>	+		+
<i>ssl-1-Gen</i>		+ (2 Landwirte)	
<i>ssl-5-Gen</i>			+
<i>ssl-7-Gen</i>		+ (2 Studenten)	
<i>ssl-9-Gen</i>		+ (2 Studenten)	
<i>ssl-10-Gen</i>		+ (2 Landwirte)	
<i>cna-Gen</i>		+ (2 Landwirte)	
<i>fib-Gen</i>	+	+ (2 Landwirte)	+
<i>sasG-Gen</i>		+ (2 Studenten)	
<i>hld-Gen</i>	+	+ (2 Landwirte)	
<i>nuc-Gen</i>	+	+ (2 Landwirte)	+

Tabelle 50: Virulenzgene der MSSA mit Herkunft der Isolate (in Klammern steht welche Herkunft die Isolate des CC hatten, die positiv waren, falls dies nicht bei allen Isolaten der Fall war).

4.12 Die MRSA-Isolate aus Europa

Die MRSA-Isolate aus Spanien (n=5), Dänemark (n=5), den Niederlanden (n=4) und der Schweiz (n=5 und n=6) wurden mit dem Microarray genotypisiert, nachdem sie analog den deutschen Isolaten angezüchtet und mit dem MALDI-TOF sowie dem VITEK2 als MRSA bestätigt worden waren. Alle erhaltenen Ergebnisse wurden in Tabelle 51 dargestellt. Die fehlenden Isolate (n=4) konnten mit dem Microarray nicht analysiert werden. Bei 86,4 % (n=22)

der schweineassoziierten ausländischen Isolate, von Schweinen, Landwirten und Staubproben, handelte sich um den ST398. Zwei Schweineisolate (9,1 %) gehörten dem ST49 an und ein Schweineisolat dem ST1 (4,5 %). Insgesamt konnten Isolate von 17 Schweinen (77,3 %), zwei Staubproben (9 %) und drei Landwirten (13,6 %) untersucht werden. Die Angaben über die *spa*-Typen, *SCC_{mec}* und Resistenzen wurden von den zusendenden Professoren gemacht und die Resistenzen mittels VITEK2 bestätigt.

Land	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	DK1	DK2	DK3	DK4	DK5
Herkunft	Sw	LW	LW	Sw	LW	St	St	Sw	Sw	Sw
MLST	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398
spaTyp	t1451	t011	t588	t011	t108	kA	kA	kA	kA	kA
SCCmec	V	IV	V	IV	V	V	V	V	IV	V
mecA-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
agrI-	x	x	x	x		x		x	x	x
agrII-										
agrIII-										
ccrA2-		x		x					x	x
ccrB2-		x		x					x	x
ccrC-	x		x		x	x	x	x		
tstI-										
sed-	x	x		x						
seg-				x						
seh-				x						
lukF-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
lukS-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ssl01-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ssl02-										
ssl03-										
ssl04-										
ssl05-										
ssl06-										
ssl07-										
ssl08-										
ssl09-										
ssl10-		x				x		x	x	x
cna-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
fib-										
fnbA-	x	x	x	x	x	x		x	x	x
fnbB-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
map-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
sasG-				x						
vWF-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
nuc1-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
hld-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
h1b-										
h1a-Gen	x	x	x	x		x		x	x	x

Land	NL1	NL2	Ch1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10
Herkunft	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw	Sw
MLST	ST398	ST398	ST49	ST398	ST1	ST49	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398	ST398
spaTyp	t011	t011	st208	st011	t2279	t208	t2034	t034	t034	t034	t034	t034
SCCmec	IV	IV	V	V	IV	V	V	V	V	V	V	V
mecA-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
agrI-	x	x		x			x		x	x	x	x
agrII-			x			x						
agrIII-					x							
ccrA2-	x	x			x							
ccrB2-	x	x			x							
ccrC-			x	x		x	x	x	x	x	x	x
tstI-				x								
sed-												
seg-											x	
seh-					x							
lukF-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
lukS-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ssl01-	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
ssl02-			x		x							
ssl03-			x		x	x						
ssl04-			x		x	x						
ssl05-					x							
ssl06-			x		x	x						
ssl07-			x		x	x						
ssl08-			x		x	x						
ssl09-			x		x	x						
ssl10-	x	x		x	x							x
cna-	x	x		x	x		x	x	x	x	x	x
fib-			x		x	x						
fmbA-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
fmbB-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
map-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
sasG-			x	x	x	x	x					x
vWF-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
nuc1-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
hld-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
hly-			x		x	x						
hly-Gen	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x

Tabelle 51: Die Isolate aus dem Ausland (Spanien, Dänemark, Niederlande und Schweiz) mit Angabe der Herkunft, der Genotypisierung und der Virulenzgene (X=Gen ist vorhanden).

Blaue Markierungen zeigen Unterschiede zu den deutschen MRSA-Isolaten aus den Schweinebetrieben an.

Die Isolate der Schweine des ST398 waren sowohl in Deutschland (Ergebnisse des Uniklinikums Heidelberg, genaue Studien zu Antibiotikaresistenzen bei Schweinen laufen noch) als auch im Ausland alle gegen Oxacillin, Penicillin, Cefuroxim und Tetracyclin resistent. Die Anzahl von 166 Schweineisolaten beruht darauf, dass von den insgesamt isolierten 172 MRSA von Schweinen nur noch 166 anzuzüchten waren bzw. zu Ergebnissen des Vitek2 führten.

Antibiotika	Deutschland	Ausland
n=Anzahl d. Isolate	n=166	n=13
Oxacillin	100 %	100 %
Benzylpenicillin	100 %	100 %
Cefuroxim	100 %	100 %
Tetracyclin	100 %	100 %
Clindamycin	75,90 %	76,90 %
Clarithromycin	73,50 %	69,20 %
Erythromycin	72,30 %	69,20 %
Trimethoprim	52,40 %	69,20 %
Gentamicin	20,50 %	15,40 %
Ciprofloxacin	9,00 %	7,70 %
Moxifloxacin	6,00 %	7,70 %
Fosfomycin	1,80 %	0 %
Fusidin Säure	1,80 %	0 %
Tigecycline	0 %	0 %
Vancomycin	0 %	0 %
Mupirocin	0 %	0 %

Tabelle 52: Resistenzen der Isolate von Schweinen, aus dem Ausland und Deutschland in Prozent.

4.13 Ergebnisse des Fragebogens

Der ausgeteilte Fragebogen wurde nur von Studenten und Tierärzten ausgefüllt und die Landwirte machten, aus Vertrauensgründen, nur mündliche Angaben zu den Antibiotikagaben in ihrem Betrieb. In der folgenden Tabelle 53 wurde der MRSA-Status der Personen mit Schweinekontakt und deren Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten dargestellt. Die Tabelle 53 zeigt, dass der Zusammenhang zwischen einer Antibiotikaeinnahme und dem Auftreten des CC398-V nicht signifikant ist ($p=1,039$).

Beruf	MRSA Status	ST	AB-Einnahme in den letzten 6 Mo.
Studentin	positiv	CC398-V	ja
Studentin	positiv	CC398-V	nein
Tierarzt	negativ	negativ	nein
Studentin	negativ	negativ	nein
Studentin	negativ	negativ	ja
Studentin	negativ	negativ	nein
Studentin	positiv	CC398-V	nein
Studentin	positiv	CC398-V	ja
Studentin	negativ	negativ	nein
Studentin	positiv	CC398-V	nein
Student	positiv	CC398-V	nein
Studentin	positiv	CC398-V	ja
Studentin	positiv	CC398-V	nein
Tierärztin	positiv	CC398-V	ja
Tierärztin	positiv	CC398-V	ja
Studentin	positiv	CC398-V	ja
Studentin	positiv	CC398-V	nein
Studentin	positiv	CC398-V	nein

Tabelle 53: Die beprobten Personen mit Schweinekontakt mit MRSA-Status und Angaben zum CC und der *SCC_{mec}* sowie zu ihren Antibiotikaeinnahmen in den letzten sechs Monaten.

5. Diskussion

5.1 MRSA-Prävalenz in Schweinebetrieben

5.1.1 MRSA-Herdenprävalenz mit MRSA-Vorkommen nach geographischer Verteilung und MRSA-Prävalenz der Schweine

In der vorliegenden Studie konnten in insgesamt 85,2 % der untersuchten Betriebe ($n=23/27$) MRSA des CC398 in Nasentupfern von Schweinen oder der Umgebung nachgewiesen werden. Von den 23 MRSA-positiven Betrieben war in 21 Betrieben mindestens ein Schwein nasal besiedelt (77,7 %) und in 22 Betrieben (81,5 %) wurden MRSA in der Umgebung nachgewiesen. In 51,9 % der Betriebe ($n=14/27$) konnten MRSA sowohl bei den Schweinen, den Landwirten als auch in den Umgebungsproben gefunden werden.

Die MRSA-Prävalenz in den beprobten Betrieben liegt unter der von Keller et al. (2010) gefundenen MRSA-Prävalenz, welche durch Nasentupferentnahme von Schweinen ermittelt wurde. Diese betrug 88,5 % an MRSA-positiven Betrieben in Nordwestdeutschland. Die höhere Anzahl positiver Betriebe in der Studie von Keller et al. (2010) lässt sich darauf zurückführen, dass Nordwestdeutschland die Region mit der höchsten Schweinedichte in Deutschland ist. Insgesamt betrachtet besitzen Niedersachsen 30,6 %, NRW 24,2 %, Baden-Württemberg 7,7 % und Hessen 2,5 % der deutschen Schweinebetriebe (Statistisches Bundesamt 2011).

In der vorliegenden Studie wurden allerdings neben Niedersachsen, Baden-Württemberg und Nordrheinwestfalen, die über 90 % positiver Betriebe aufwiesen auch Hessen beprobt, mit einer weitaus geringeren Schweinedichte und nur 75 % ($n=9/12$) MRSA-positiver Betriebe. Die geringere Prävalenz in Hessen ist auf die geringere Schweinedichte des Bundeslandes zurückzuführen und senkt somit die Gesamtprävalenz der vorliegenden Studie.

Vergleicht man dagegen die Betriebsprävalenz von Keller et al. (2010) von 88,5 % mit den Ergebnissen an positiven Betrieben dieser Studie, ermittelt nur durch Nasentupfer von Schweinen aus Niedersachsen, kommt man mit einer Betriebsprävalenz von 90,9 % ($n=10/11$) zu vergleichbaren Ergebnissen. Diese lassen sich somit auf die Schweinedichte der Region zurückführen, da Niedersachsen 30,6 % aller Schweinebetriebe in Deutschland besitzt (Statistisches Bundesamt 2011) und die Ergebnisse somit für eine gute Probenentnahme und Anzucht sprechen.

In Nordrheinwestfalen wurden von Harlizius et al. (2010) in 70 % der Schweinebetriebe ($n=28/40$) MRSA aus Nasentupfern isoliert, was unter den 77,7 %, durch Nasentupfer ermittelten positiven Betrieben dieser Studie liegt. Zu beachten ist dennoch, dass in der vorliegenden Studie nur zwei Betriebe in Nordrheinwestfalen lagen, von denen 50 % anhand von Nasentupfern und 100 % mit Nasentupfern oder Umgebungsproben positiv getestet wurden.

In Niedersachsen fanden Schulte-Wuelwer et al. (2010) in 57,4 % der untersuchten Schweinebetriebe MRSA im Staub oder in Nasentupfern ($n=31/54$). Somit liegt die MRSA-Prävalenz von Schulte-Wuelwer et al. (2010) auch unter der MRSA-Gesamtbetriebsprävalenz von 85,2 % in dieser Studie, ermittelt anhand von positiven Schweine- und Umgebungsisolaten. Des Weiteren lag sie auch unter der Betriebsprävalenz aus Niedersachsen von 90,9 %.

Tenhagen et al. (2010) wiesen in nur 52,4 % der beprobten Betriebe in Deutschland ($n=152/290$) MRSA in Staubproben nach. Auch Köck et al. (2009) erfassten eine Betriebsprävalenz von 59 % ($n=51/86$), durch den MRSA-Nachweis in Umgebungsproben sowie bei 70 % der untersuchten Betriebe ($n=28/70$) durch MRSA-Nachweis in Nasentupfern von Schweinen. Dagegen lag in dieser Studie eine weitaus höhere Prävalenz von 81,5 % der Betriebe mit MRSA in der Umgebung vor. Außerdem wurden 77,7 % der Betriebe anhand von Schweinenasentupfern als MRSA-positiv identifiziert, was auch über den Ergebnissen der anderen Studien liegt. Eine mögliche Ursache für die geringeren Bestandsprävalenzen von Tenhagen et al. (2010) und Schulte-Wuelwer et al. (2010), trotz ähnlicher Anzucht mit vorheriger Anreicherung, könnte die mittlerweile noch bessere Anpassung der MRSA an die Schweine und die vermutlich erhöhte Virulenz durch weitere Aufnahme von Virulenzfaktoren sein, da die vorliegende Studie über drei Jahre später durchgeführt wurde. Darauf deuten auch die Studien von Frick (2010), aus Bayern, mit einer Betriebsprävalenz, ermittelt durch Schweinenasentupferentnahme, von 45 % ($n=27/60$), sowie von Fischer (2011) mit einer Betriebsprävalenz von 66,7 % ($n=12/18$), ermittelt durch Staubproben hin. Auch diese Ergebnisse bleiben hinter den Prävalenzen der vorliegenden Studie zurück. Dagegen konnte Brockers (2011), durch Staubprobenentnahme in Ost- und Nordwestdeutschland, eine Betriebsprävalenz von 81 % nachweisen ($n=39/48$), allerdings wieder in der schweinedichtesten Region Deutschlands.

Auch in den Niederlanden konnten Broens et al. (2010) in nur 56 % ($n=28/50$) der beprobten Schweinebetrieben MRSA in Nasentupfern nachweisen. Van Duikeren et al. (2007) wiesen in

nur 23 % (n=7/31) der mit Nasentupfer von Schweinen untersuchten niederländischen Betriebe MRSA nach und blieben somit auch weit unter der Anzahl an MRSA-positiven Betrieben in dieser Studie zurück. Die geringere MRSA-Prävalenz in den Niederlanden könnte auf das Resistenzmonitoring von MRSA in Krankenhäusern bei Einlieferung zurückzuführen sein, welche sowohl eine Übertragung von Landwirten und Tierärzten auf andere Patienten als auch eine Übertragung von MRSA von Landwirten auf ihre Schweine, sowie die resultierende Rückübertragung, reduziert. Noch geringere Prävalenzen wären durch die Einführung eines Entlassungsscreenings zu erzielen, um die Übertragung von neu erworbenen MRSA bzw. MRSA des ST398 mit neuen Virulenzgenen durch horizontalen Gentransfer, von den Landwirten nach einem Krankenhausbesuch auf ihre Schweine zu unterbinden und den Kreislauf der vermutlichen Virulenzsteigerung der MRSA aus den Krankenhäusern heraus zu durchbrechen.

Zu ebenfalls geringeren Ergebnissen, verglichen mit dieser Studie, kamen Battisti et al. (2010) und fanden in Italien in nur 38,1 % der untersuchten italienischen Schweinebetriebe (n=45/118) MRSA in Schweinenasen und auch in Ontario/Kanada lag die von Kanna et al. (2010) ermittelte Betriebsprävalenz bei 45 % (n=9/20).

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der Betriebsprävalenzen der vorliegenden Studie im oberen Drittel, der bisher durchgeführten MRSA Studien mit Schweinen und Umgebungsproben im In- und Ausland, einordnen. Dies geht einerseits auf eine immer weiter gestiegene Ausbreitung der MRSA durch Zukauf aus positiven Ferkelerzeugerbetrieben und von Jungsauenproduzenten (Armand-Lefèvre et al. (2005), Van Duijkeren et al. (2007), Smith et al. 2009) hervor. Andererseits wird die Anpassung der MRSA, des ST398, der in dieser Studie als einziger ST in den Schweinebetrieben vorkam, an die Schweine immer besser und der Erwerb von Virulenzfaktoren von HA- und CA-MRSA steigt an. Dies deckt sich auch mit der erhöhten Anzahl an Virulenzgenen in dieser Studie und führt vermutlich über längere Zeit gesehen zu einem Anstieg der Virulenz der MRSA des ST398. Somit wäre ein MRSA-Screening der Zuliefererbetriebe erforderlich, um die Weiterverbreitung von MRSA auf andere Betriebe und deren Landwirte einzudämmen. Außerdem müsste ein MRSA-Screening, aller Personen mit Schweinekontakt vor und nach einem Krankenhausaufenthalt zur Vermeidung der Weiterübertragung durchgeführt werden.

In der vorliegenden Studie waren 50,1 % der untersuchten Schweine (n=172/343) nasal mit MRSA besiedelt. Keller et al. (2010) konnten MRSA in 54,8 % (n=126/230) der untersuchten Nasentupfer von Schweinen aus Nordwestdeutschland nachweisen und erhielten somit eine nur

etwas höhere Prävalenz, im Vergleich zu der vorliegenden Studie, trotz der hohen Schweinedichte in Nordwestdeutschland. Auch in der Studie von Schulte-Wielwer et al. (2010) aus Niedersachsen wurde eine MRSA-Prävalenz von 43,6 % bei Schweinen (n=235/540) festgestellt. Diese liegt nur geringfügig unter den Ergebnissen dieser Studie und die Anzucht mit vorheriger Anreicherung war identisch. In Bayern erhielt Frick (2010) eine geringere MRSA-Prävalenz von 33,3 % durch die Entnahme von Schweinenasentupfern (n=211/634). Dies deutet wiederum auf eine gestiegene Verbreitung der MRSA unter den Schweinen, eine vermutlich erhöhte Virulenz, verglichen mit dem Jahr 2010 in dem die Studie von Schulte-Wielwer et al. stattfand, sowie auf eine angestiegene Durchseuchung der Betriebe, auch in Regionen mit geringerer Schweinedichte hin.

In Belgien wiesen Denis et al. (2009) unter Schweinen, die auch mit Nasentupfern beprobt wurden, bei 44,2 % (n=663/1500) MRSA nach und erhielten eine etwas geringere Prävalenz als in dieser Studie und in Ontario/Kanada waren nur 24,9 % (n=71/285) der von Khanna et al. (2008) untersuchten Schweine mit MRSA infiziert.

In Studien mit Schweinen, die auf dem Schlachthof vor der Schlachtung mit Nasentupfern auf das Vorkommen von MRSA untersucht wurden, konnten Wulf et al. (2008) zeigen, dass 39 % der beprobten Schlachthofschweine MRSA-Träger waren. Auch De Neeling et al. (2007) untersuchten 540 Schweine, aus neun verschiedenen Schlachthöfen in den Niederlanden und fanden eine MRSA-Prävalenz von 39 % (n=209/540). Im Schlachthof von Teneriffa konnte sogar eine MRSA-Prävalenz bei Schweinen von 85,7 % (n=257/300) von Arias et al. (2011) nachgewiesen werden. Diese sehr hohe MRSA-Prävalenz im Vergleich zu der vorliegenden Studie (50,1 %) lässt sich auf den engen Kontakt der Schweine auf der Insel Teneriffa zurückführen, aufgrund der geographischen Bedingungen. Auf der Insel werden Schweine außerdem unter den einzelnen Betrieben verkauft und somit die MRSA verbreitet. Des Weiteren konnte Broens et al. (2010) zeigen, dass die MRSA-Prävalenz bei Schweinen im Schlachthof höher sei als bei den gleichen Schweinen zuvor in den Betrieben. Dies weist darauf hin, dass eine schnelle Übertragung der MRSA in kurzer Zeit unter engen Haltungsbedingungen und Stress erfolgen kann und weiter ansteigen wird, worauf die erhöhten Prävalenzen in dieser Studie hindeuten.

In der vorliegenden Studie ist insgesamt auffällig, dass die MRSA-Betriebsprävalenz, von 77,7 %, die durch Nasentupferentnahme von Schweinen ermittelt wurde, höher ist als die MRSA-Prävalenz der Schweine mit 50,1 %. Dies stimmt auch im Vergleich der MRSA-

Bestandsprävalenz mit der Prävalenz der beprobten Schweine, bei Keller et al. (2010) von 88,5 % und 54,8 %, bei Schulte-Wuelwer et al. (2010) von 57,4 % und 43,6 %, bei Van Duijkeren et al. (2007) von 23 % und 11 % sowie bei Khanna et al. (2008) von 45 % und 24,9 %, überein.

Auch anhand der MRSA-Prävalenz bei Schweinen sind die Ergebnisse der vorliegende Studie im oberen Drittel, im Vergleich zu anderen bisher stattgefundenen Untersuchungen, einzuordnen und zeigen wiederum die gesteigerte MRSA-Ausbreitung und deuten bereits auf die vermutlich erhöhte Virulenz hin, durch den Erwerb neuer Virulenzgene, welche ebenfalls in dieser Studie neu gefunden wurden, verglichen mit den ST398 Isolaten vergangener Jahre.

5.1.2 Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA

Die Intraherdenprävalenz der Schweine mit MRSA lag bei durchschnittlich 67,3 %. Unter den Betrieben waren vier hochprävalente Betriebe mit über 95 % positiver Schweine und sechs (n=6/27) niedrigprävalente, mit einer Intraherdenprävalenz von 0 %. Die meisten Betriebe wiesen Intraherdenprävalenzen von über 50 % auf (n=16/27). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich um keine Einzeltierkrankung im Bestand handelt, sondern um ein Bestandsproblem. Brockers (2011) erhielt eine geringere Intraherdenprävalenz von nur 49 %, im Vergleich zu der vorliegenden Studie, allerdings mit gepoolten Nasentupfern von Schweinen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die leicht divergierende Anzahl an beprobten Schweinen pro Betrieb einen geringen Einfluss auf das Finden von positiven Schweinen hat, da bis auf einen Betrieb immer mindestens ein Viertel der beprobten Schweine positiv waren und somit bei mindestens 10 beprobten Schweinen pro Betrieb kaum Betriebe mit MRSA, durch Nasentupferentnahme, nicht erkannt werden.

Insgesamt ist aber auffällig, dass selten im Bestand MRSA bei allen Schweinen nachgewiesen werden konnte. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass eine ausreichende Konkurrenzflora mit MSSA vor der Besiedelung schütze, wie Meemken et al. (2008) und Van Cleef et al. (2013) nachgewiesen haben und welche auch in der vorliegenden Studie als Zufallsbefund gefunden und mitanalysiert wurden. Auch Nathaus et al. (2010) zeigten, dass Ferkel mit nasaler MSSA-Besiedelung, in ihrem weiteren Leben nur halb so oft MRSA-Träger sind, als nicht mit MSSA besiedelte Schweine. Des Weiteren können Schweine ihren MRSA-Status ändern und MRSA-negativ werden, was auch erklärt warum nicht alle Schweine betroffen sind (Weese et al. 2010).

5.1.3 MRSA-Prävalenz bei unterschiedlichen Altersklassen: Ferkel, Absetzer, Mastschweine, Sauen und Deckeber

In dieser Studie wurde die höchste MRSA-Prävalenz bei den Absetzern mit 64,3 % ($n=72/112$) und den Mastschweinen mit 53,8 % ($n=28/52$) festgestellt. Dann folgten die Deckeber mit 50 % ($n=1/2$), von denen allerdings nur zwei beprobt wurden, die Ferkel mit einer Prävalenz von 42,9 % ($n=54/126$) und die Sauen mit 33,3 % ($n=17/34$). Die Unterschiede der Prävalenz des MRSA-Vorkommens zwischen den einzelnen Altersklassen waren signifikant ($p<0,001$).

Frick (2010) erhielt eine ähnlich hohe MRSA-Prävalenz von Ferkeln mit 37,6 %, wie in dieser Studie mit 42,9 %. Die hohe Prävalenz der Absetzer gegenüber den Ferkeln ist auf den steigenden Stress und die daraus resultierende Immunsuppression zurückzuführen, sodass v.a. Absetzer gefährdet sind mit MRSA kolonisiert zu werden. Die hohe Prävalenz bei Absetzern erklärte auch Weese et al. (2010) durch den Stress beim Absetzen, dem Zusammensetzen MRSA-positiver und negativer Ferkel sowie dem vermehrten Staubaufkommen mit zunehmendem Alter und zunehmender Bewegung. Einige Schweine werden mit zunehmenden Alter wieder MRSA-negativ und auch die Sauen bauen mit ansteigendem Alter ein besseres Immunsystem auf, was ihre geringere Besiedelung mit MRSA erklärt (Frick 2010) und eine weitere Begründung ist, warum nicht bei allen Tieren, aus MRSA-positiven Betrieben, MRSA nachgewiesen wurden.

Die hohe MRSA-Prävalenz bei Absetzern und Mastschweinen erklärt Van Duijkeren et al. (2007) durch den Zukauf von MRSA-positiven Schweinen und der schnellen Verbreitung. Dies geschieht aufgrund des Stresses und des engen Tierkontaktes im Flatdeck. Auch Staub mit MRSA, der auch in dieser Studie eine hohe MRSA-Prävalenz aufwies, führt zu einer raschen Besiedelung der neu eingestellten Tiere.

Bei Mastschweinen erhielt de Neeling et al. (2007) eine Prävalenz von nur 39 % und auch Frick (2010) nur eine Prävalenz von 35,6 %, im Gegensatz zu den 53,8 % positiver Mastschweine dieser Studie. Frick (2010) erhielt in Bayern eine etwas geringere MRSA-Prävalenz von Sauen mit 23,9 % im Vergleich zu den 33,3 % dieser Studie. Die geringe MRSA-Prävalenz der Sauen, im Vergleich zu den anderen Altersklassen, hängt mit dem besser ausgeprägten Immunsystem und geringeren Antibiotikaeinsatz zusammen, da eher bei Bedarf des Einzeltieres Antibiotika gegeben werden. Außerdem erklärte Frick (2010), dass die Haltung der Sauen in Kastenständen oder

Kleingruppen mit weniger Kontakt zu anderen Schweinen und konstanteren Gruppen zu einem geringeren MRSA-Infektionsrisiko führen.

Meemken et al. (2008a) fand bei keiner der untersuchten Sauen in Nordwestdeutschland MRSA ($n=0/39$). Auch in der Studie von Meemken et al. (2008a) wurde eine MRSA-Prävalenz von 17,5 % der Absetzer, 11,1 % der Mastschweine und 10,2 % der Ferkel nachgewiesen, die unter den Ergebnissen dieser Studie liegen. Zwambag et al. (2009) zeigten, dass Ferkel einer MRSA-positiven Mutter ein 6,7 % höheres Risiko haben sich bis zum Absetzen mit MRSA zu infizieren, als Ferkel einer negativen Mutter.

Die hohen MRSA-Prävalenzen bei den verschiedenen Altersklassen dieser Studie zeigen, im Vergleich zu den Ergebnissen anderer früherer Studien, dass sich MRSA unter den Schweinen vermehrt ausgebreitet haben, durch das Erwerben von weiteren Virulenzfaktoren, wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde und durch die hohe Übertragungsrate unter den Schweinen.

5.2 MRSA-Prävalenz bei Landwirten, Tierärzten und Studenten

Bei 59,3 % der untersuchten Betriebe ($n=16/27$) in dieser Studie wurden MRSA bei den Landwirten isoliert. Insgesamt waren 56,4 % der Landwirte ($n=22/39$), 22,2 % der Tierärzte ($n=2/9$) und 68,8 % der Tiermedizinstudenten ($n=11/16$) mit MRSA kolonisiert. Davon waren in 15 Betrieben ($n=15/27$) sowohl die Landwirte als auch ihre Schweine MRSA-Träger und in 14 Betrieben sowohl die Landwirte, die Schweine als auch die Umgebung positiv. Nur in einem Betrieb war der Landwirt aber weder seine Schweine noch die Umgebungsproben MRSA-positiv. Dieser Landwirt kann sich allerdings auch außerhalb seines Stalles mit MRSA infiziert haben. In drei Betrieben waren die Schweine mit MRSA kolonisiert ohne, dass die entsprechenden Landwirte des Hofes sich infiziert hatten. Auffällig ist, dass alle Isolate von schweineassoziierten Menschen dem ST398 angehören, wie auch alle Umgebungs- und Schweineisolate dieser Studie.

Die hohe Anzahl an kolonisierten Studenten, Tierärzten und Landwirten kann auf die hohe MRSA-Prävalenz im Staub zurückgeführt werden. Allerdings wurde die Nasentupferentnahme von den schweineassoziierten Personen selbst durchgeführt ohne Fachleute zum genauen Vergleich der Probenentnahme. Vermutlich läge die Prävalenz noch höher wenn alle Proben vom gleichen Arzt mit exakt gleicher Eindringtiefe in die Nase entnommen worden wären.

Auch die Studie von Nathaus et al. (2010) mit 68 % MRSA-positiven Staubmasken, nach dem Besuch eines Schweinebetriebes, zeigt das hohe MRSA-Besiedelungsrisiko für Menschen im

Schweinebetrieb mit MRSA des ST398. Dies zeigt auch die hohe MRSA-Prävalenz unter den Tiermedizinstudenten, die in den Betrieben innerhalb kurzer Zeit mit MRSA besiedelt werden, während ihres zweiwöchigen Praktikums in der Schweineklinik und ohne sonstigen regelmäßigen Kontakt zu Schweinen. Bisher wurden bekannterweise noch keine Tiermedizinstudenten in anderen Studien auf das Vorkommen von MRSA nach einem Aufenthalt im Schweinebetrieb untersucht, allerdings werden Tierärzte bereits vom Robert-Koch Institut als MRSA-Risikogruppe eingestuft (Wulf et al. 2008, Nathaus et al. 2010).

Das hohe Risiko der Landwirte sich in ihrem Betrieb mit MRSA zu besiedeln und diese weiter zu übertragen zeigte auch Voss et al. (2005), da er nachwies, dass MRSA des ST398, zwischen niederländischen Schweinebauern mit positiven Schweinen und von diesen auf ihre Familienmitglieder ohne Schweinekontakt übertragen werden können. In Frankreich konnte Armand-Lefèvre (2005) zeigen, dass Schweinebauern ein höheres Risiko haben mit MRSA kolonisiert zu werden als die normale Bevölkerung.

Des Weiteren besteht somit auch ein Risiko für die Gesellschaft, durch die Übertragung von MRSA des ST398 auf Personen ohne Schweinekontakt sowie die Einschleppungsgefahr in Krankenhäuser mit Übertragung auf andere Patienten. Daran schließt sich eine Rückübertragung potentiell virulenter gewordener ST398 auf die Schweine des Landwirtes nach einem Krankenhausaufenthalt an und der Kreislauf der vermutlichen Virulenzsteigerung durch den Erwerb immer neuer Virulenzgene geht aufgrund noch fehlender Entlassungsscreenings weiter. Das Auftreten des ST398 in dem Universitätsklinikum Heidelberg wurde in dieser Studie bereits belegt. Denis et al. (2009) konnten zwar eine geringere MRSA-Prävalenz von 37,8 %, bei untersuchten Landwirten (n=48/127) in Belgien nachweisen. Jedoch liegt auch diese Prävalenz schon weit über der MRSA-Prävalenz in belgischen Krankenhäusern.

In den Niederlanden konnten Wulf et al. (2010) bei 50 % der untersuchten Schweinebauern MRSA nachweisen (n=13/26), was sich auch mit den Ergebnissen dieser Studie deckt. Bei bayerischen Landwirten erhielt Frick (2010) nur eine MRSA-Prävalenz von 29,3 % (n=34/116), durch die Entnahme von Nasentupfern. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie noch Niedersachsen mit einer hohen Schweinedichte beprobt und auch in den Niederlanden ist die Schweinedichte sehr hoch. Im Gegensatz zu den 22,2 % MRSA-positiver Tierärzte, in der vorliegenden Studie, erhielten Wulf et al. (2008) nur eine MRSA-Prävalenz von 12,5 % bei der Beprobung von Schweinetierärzten einer Schweinegesundheitskonferenz in Dänemark. Allerdings könnten die Tierärzte auch schon während ihrer Anreise ihre MRSA-Trägerschaft

verloren haben. Die insgesamt geringere MRSA-Prävalenz bei Tierärzten, im Vergleich zu den Landwirten, sowohl in der Studie von Wulf et al. (2008) als auch in der vorliegenden, kann auf die geringere Expositionsdauer von Tierärzten zu MRSA verseuchtem Staub und Schweinen als auch auf die Möglichkeit der Dekolonisation nach einigen Tagen zurückzuführen sein. Diese wichtige Übertragungsmöglichkeit über die Stallluft sowie den direkten Schweinekontakt stellten auch Denis et al. (2009) heraus. Auch Huber et al. (2011) konnten durch Nasentupferentnahme in der Schweiz nur bei 3 % (n=4/133) der beprobten Tierärzte MRSA nachweisen.

Im Schlachthof von Teneriffa wurden insgesamt 9,3 % (n=5/43) der anwesenden Schweinebauern (n=3/17), Tierärzte (n=1/19) und Metzger (n=1/7) positiv auf MRSA des ST398 getestet (Arias et al. 2011) und auch Van Cleef et al. (2010) fand eine geringe MRSA-Prävalenz von 5,6 % (n=14/249) bei Metzgern in Schlachthöfen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der MRSA verseuchte Staub ein höheres Infektionsrisiko darstellt als die Schweine, dem Tierärzte und Metzger nicht in dem hohen Maße wie Landwirte ausgesetzt sind. Außerdem besteht für Tierärzte und andere Personen ohne täglichen Schweinekontakt die Möglichkeit die MRSA-Trägerschaft nach einigen Tagen wieder zu verlieren (Denis et al. 2009).

5.3 MRSA Prävalenz von Umgebungsproben

Insgesamt waren in der vorliegenden Studie 56,3 % der Umgebungsproben (n=72/128) MRSA-positiv. In den entnommenen Umgebungsproben wurden bei 52,4 % der Spielketten (n=22/42), 50 % der Tränken (n=14/28), 70 % der Sockentupfer (n=21/30) und 53,6 % der Staubproben (n=15/28) MRSA nachgewiesen. Frick (2010) erhielt in Bayern eine Prävalenz von 66% (n=63/96) bei Staubproben und 78 % durch Sockentupferentnahme (n=74/95), welche etwas über den Prävalenzen der vorliegenden Studie liegen, allerdings beprobte er nur Mastbetriebe in denen das Staubvorkommen, durch die erhöhte Bewegung großer Tiere hoch ist. Von Nathaus et al. (2010) konnten bei 68 % der Staubmasken, welche von Tierärzten in Beständen getragen wurden, MRSA nachgewiesen werden. Dies zeigt das hohe Risiko der MRSA-Übertragung durch Staub auf den Menschen. Auch Broens et al. (2010) wiesen MRSA im Stallstaub nach und bestätigen das Risiko der MRSA-Transmission durch Staub von infizierten Schweinen auf andere Tiere und auf Menschen. Die Ergebnisse dieser Studie sowie auch von Frick (2010) zeigen, dass die Sensitivität für den MRSA-Nachweis der Sockentupfer höher ist als bei den Staubproben. Fischer (2010) analysierte Tränkenippel und Spielketten beim Einstallen, wobei schon 20 %

beim Einstallen positiv waren und 100 % beim Ausstallen. Die hohe Besiedelungsrate von 50 % der Tränken und 52,4 % der Spielketten, die in dieser Studie erfasst wurde, ist auf die hohe Tenazität der MRSA zurückzuführen. Zwar waren nur 50 % der untersuchten Tränken positiv jedoch wurden die Tiere zu der Zeit auch noch nicht ausgestallt, wie in der Studie von Fischer (2010), mit 100 % MRSA-positiven Tränken am Ende des Mastdurchganges. Durch ihre Fähigkeit Biofilme zu bilden und an der Oberfläche zu haften sind MRSA schlecht zu beseitigen und im nächsten Durchgang der Stallbelegung noch vorhanden, wie Fischer (2010) zeigte. Auch in der vorliegenden Studie waren in 95,7 % der Betriebe (n=22/23) sowohl der Staub als auch die Schweine MRSA-positiv, was die Ansteckungsgefahr für neu eingestellte Schweine über den MRSA verseuchten Staub bestätigt. Ebenfalls wurde in 51,9 % der untersuchten Betriebe (n=14/27) MRSA sowohl bei den Umgebungsproben, den Schweinen und den Landwirten des Betriebes nachgewiesen, mit dem ST398, was zeigt, dass sich die Landwirte über ihre Schweine und über den Staub anstecken können.

Auch die Spielketten und Tränken stellen, da sie sowohl in ständigem Kontakt mit den Schweinen als auch dem Staub sind, eine ständige Infektionsquelle für neue Schweine dar. Sowohl auf diesen Oberflächen als auch im Staub können MRSA bis zu sechs Monate überleben, jedoch mindestens bis zum nächsten Durchgang, da Schweineschuppen und Kot im Staub eine gute Nahrungsgrundlage bilden, vor allem an Orten, die für die Reinigung und Desinfektion schwer zugänglich sind. So stellen Staub und Gegenstände bei unzureichender und zu kurzer Reinigung und Desinfektion eine ständige Infektionsquelle dar. Dies zeigt auch den hohen Schweregrad MRSA freie Schweinebestände zu erhalten.

Die im Vergleich zur MRSA-Prävalenz von Schweinen mit 50,1 % etwas höhere MRSA-Prävalenz der Umgebungsproben mit 56,3 % kann mit dem ständigen Kontakt zu Antibiotika im Futterstaub zusammenhängen (Murphy et al. 2007). Dieser ständige Kontakt, sowie die Konkurrenzflora haben schon früh zu einer Selektion der MRSA geführt, was auch die Dominanz des ST398 erklärt und sie können im Staub viel länger überleben und sich ständig Vermehren, als in einem nur sechs Monate lebenden Schwein.

5.4 MRSA in unterschiedlichen Betriebsstrukturen

Die höchste MRSA-Prävalenz, ermittelt durch Nasentupfer von Schweinen und Staub, lag bei den Ferkelerzeugern in dieser Studie bei 80 % (n=4/5) sowie den Systemen mit Ferkelerzeugung

und angeschlossener Mast bei 78,6 % (n=11/14). Die Mastbetriebe wiesen eine MRSA-Prävalenz von 71,4 % auf (n=5/7). Des Weiteren war noch ein positiver Jungsauenbetrieb in der Studie erfasst worden aber ohne weiteren Betrieb zum Vergleich.

Die hohe MRSA-Prävalenz der Ferkelerzeuger geht darauf zurück, dass Ferkel positiver Sauen ein 6,7fach höheres Risiko haben sich mit MRSA zu infizieren als Ferkel MRSA-freier Sauen, wie Zwambag et al. (2009) beschrieben haben.

Die MRSA-Prävalenz in der Ferkelerzeugung mit angrenzender Mast ist etwas geringer, da MRSA-positive Ferkel ihre Trägerschaft wieder verlieren können, wie Weese et al. (2010) beschrieb. Die sehr hohen Prävalenzen, sowohl bei den Ferkelerzeugern als auch den Ferkelerzeugern mit angeschlossener Mast lassen sich durch den Stress beim Absetzen, dem Zusammensetzen MRSA-positiver und negativer Tiere, dem gesteigerten Risiko der MRSA-Infektion für Absetzer aufgrund des Stresses, der Neugruppierung im Flatdeck und der gesteigerten Tierdichte mit einer höheren Anzahl an Kontakten zu anderen Schweinen erklären (Frick 2010, Weese et al. 2010). Außerdem nimmt die Selektion der MRSA durch weitere Antibiotikagaben in der Mast, angefangen mit der Einstallbehandlung zu. Dabei steigt die Anzahl resistenter MRSA folglich immer weiter (Meemken et al. 2008).

Fischer (2011) erhielt eine MRSA-Prävalenz von 75 % bei Mastbeständen, 70 % bei Ferkelerzeugern und 50 % bei Ferkelerzeuger mit angeschlossener Mast, die mit den Prävalenzen dieser Studie korrelieren. Frick (2010) ermittelte in Bayern MRSA-Prävalenzraten von 63,2 % der Mastbetriebe und 50 % der Ferkelerzeuger mit angeschlossener Mast, durch Nasentupferentnahme, welche unter den Prävalenzen dieser Studie liegen. Allerdings wurden in der vorliegenden Studie auch die schweinedichte Region um Vechta in Niedersachsen beprobt. Auch das Bundesministerium für Risikobewertung erhielt 2009 weitaus geringere Ergebnisse mit einer MRSA-Prävalenz, ermittelt durch Staubproben von nur 58 % der Mastbetriebe und 29 % bei Ferkelerzeugern mit anschließender Mast. Jedoch liegen auch die Ermittlungen des BfR (2009) schon vier Jahre zurück und seitdem ist die MRSA-Prävalenz in deutschen Schweineherden angestiegen, wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen konnten.

5.5 Ergebnisse der MRSA-Anzucht

In der vorliegenden Studie wurden mittels Anzucht in der CASO-Bouillon, auf dem COS-5 %-Agar, dem MRSA-ID-Agar und Durchführung des Katalasetest und Pastorex-Staph-Plus Test

zunächst 175 Schweine (60,1 %), 74 Umgebungsproben (25,4 %) und 43 schweineassoziierte Menschen für MRSA-positiv befunden.

Davon identifizierte der MALDI-TOF ein Isolat einer Umgebungsprobe als *S. sciuri* (n=1/292, 0,3 %) und auch der VITEK2 erkannte dieses Isolat als *S. sciuri*. Der Vitek2 entdeckte unter den für MRSA gehaltenen Isolaten noch zwei Schweine mit MSSA (n=2/292, 0,7 %). Später selektierte der Microarray unter den für MRSA gehaltenen Isolaten, noch sechs schweineassoziierte Menschen als MSSA-Isolate aus, sowie ein Schweineisolat.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits die Anzuchtverfahren alleine sehr gut für die MRSA-Identifikation geeignet sind und wenige falsch positive Ergebnisse vorkamen, die mit dem MALDI-TOF, VITEK2 und Microarray später identifiziert wurden. Dies wiesen auch Dubois et al. (2010) nach, indem sie 151 von 152 Staphylokokken Isolaten (99,3 %), die zuvor schon als *S. aureus* identifiziert wurden, auch mit dem MALDI-TOF richtig bestimmten (Giammarinaro et al. 2005, Dubois et al. 2010).

Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, in der der MALDI-TOF und der VITEK2, alle Isolate identisch für *S. aureus* befanden und nur einen *S. sciuri* aussortierten, versagte der MALDI-TOF, in einer Studie von Delmas et al. (2008) nur bei einem Staphylokokken Isolat, während der VITEK2 16 Isolate der falschen Spezies zuordnete. Zur Identifikation von MSSA-Isolaten zeigte sich der Microarray in der vorliegenden Studie dem Vitek2 und dem MALDI-TOF überlegen, da er noch sieben MSSA-Isolate erkannte, die von beiden anderen Geräten für MRSA gehalten wurden.

Die Isolate der 163 Krankenhauspatienten, deren MRSA zum Vergleich mit den schweineassoziierten Isolaten dienten, wurden genauso wie die schweineassoziierten Proben angezüchtet, mittels CASO-Bouillon, COS-5 %-Agar und MRSA-ID-Agar, MALDI-TOF sowie Vitek2 zu 100 % als *S. aureus* bestätigt. Ihre Methicillinresistenz wurde dann mit dem VITEK2 und der *mecA-/femB*-PCR bestätigt bevor sie mit dem Microarray untersucht und alle für MRSA befunden wurden, was wiederum für die gute MRSA-Anzucht und Nachweis der vorliegenden Studie spricht.

Allerdings konnte hier keine Prävalenzstudie über die Zahl MRSA-positiver Krankenhauspatienten durchgeführt werden, da die Proben der Krankenhauspatienten der täglichen Diagnostik des MRSA-Labors, des Departments für Infektiologie, Sektion Krankenhaus- und Umwelthygiene, des Universitätsklinikums Heidelberg entstammten. Im

Rahmen der Dissertation war nur ein begrenzter Kontakt zu neuen MRSA-Verdachtsproben möglich da der Großteil der falsch-positiven Proben schon vor ihrer Ankunft im MRSA-Labor als negativ aussortiert wurden, sodass fast ausschließlich reine MRSA-Kulturen vorlagen. Die jährliche Zahl der MRSA-Fälle in deutschen Krankenhäusern wird jedoch auf über 132 000 geschätzt und über 18 bis 20 % aller aus klinischen Untersuchungsmaterialien im stationären Versorgungsbereich nachgewiesenen *S. aureus* sind MRSA (Köck et al. 2011).

5.6 Genotypen der Isolate von Schweinen, Umgebungsproben, schweineassoziierten Menschen und der Krankenhauspatienten

In dieser Studie konnten alle MRSA-Isolate von Schweinen, Umgebungsproben sowie schweineassoziierten Menschen, aus Deutschland, dem CC398 zugeordnet werden. Als verschiedene ST kam der CC398-V mit 84,8 % (n=112/132) am Häufigsten unter den Schweineisolaten vor. Der CC398-IV trat bei 6,8 % (n=9/132) der Isolate auf und 3,8 % (n=5/132) der Schweineisolate gehörten zu einem CC398 mit atypischer *SCC_{mec}*-Kassette. Weitere 4,5% der Schweine konnten nur dem CC398 zugeordnet werden, ohne *SCC_{mec}*-Zuordnung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Köck et al. (2009), die unter den Isolaten von Schweinen nur den ST398 fanden. Auch Morcillo et al. (2011) konnten bei Schlachtschweinen, Metzgern, Landwirten und Tierärzten auf dem Schlachthof von Teneriffa, nur den ST398-V und ST398-IV nachweisen, die auch bei MRSA von belgischen Schweinebauern in der Studie von Denis et al. (2009) nachgewiesen wurden. Auch Meemken et al. (2010) bestimmten 95 % der untersuchten MRSA-Isolate von Schweinen (n=57/60) aus Nordwestdeutschland als ST398 und nur 5 % der Isolate gehörten dem ST97 an. Auch in Italien isolierten Battisti et al. (2010) in 49 % (n=22/45) der MRSA-positiven Betriebe den ST398 und sehr selten den rinderassoziierten ST97, den menschenassoziierten ST1 mit *SCC_{mec}*-V sowie den ST9 und den ST1476.

Der ST1, der zum CC1 gehört und den CA-MRSA zugeordnet werden kann, konnte auch von Franco et al. (2011) in Staubproben aus Italien, Spanien und Zypern sowie bei italienischen Schweinen nachgewiesen werden nachdem sie vom Menschen auf diese übertragen wurden. Bei den schweineassoziierten Isolaten der vorliegenden Studie konnte nur der ST398 isoliert werden, allerdings kam der ST-1 bei einem Schweineisolat aus der Schweiz und der ST49 bei zwei Schweizer Schweinen vor. Dies zeigt, dass auch andere ST als der ST398, falls Landwirte nach

einem Krankenhausaufenthalt Träger sind, in einen Betrieb eingetragen werden können. Dies führt dann wieder zur Selektion und dem Rückübertragen virulenterer und anders resistenter MRSA auf den Menschen. Der ST1 trat auch bei drei Krankenhauspatienten des Universitätsklinikums Heidelberg auf.

Unter den analysierten Krankenhauspatientenisolaten dieser Studie konnten insgesamt 24 verschiedene MRSA-ST gefunden werden. Darunter war der ST5/ST225-MRSAII/Rhein-Hessen der Dominierende mit 54,3 % (n=76/140). Er kam sowohl unter den infizierten (58,3 %, n=42/72) als auch den kolonisierten Patienten (50 %, n=34/68) am häufigsten vor. Am Zweithäufigsten kam der CC22-MRSA-IV mit 8,6 % (n=12/140) unter den Krankenhauspatienten vor sowie am dritthäufigsten der CC8-MRSA-IV(sea+), Lyon Clone/UK-EMRSA-2 mit 6,4% (n=9/140).

In China wurde dieser ST9 bereits in Staubproben aus Schweinebetrieben nachgewiesen (Wagenaar et al. 2009) und auch andere ST, die häufig beim Menschen vorkommen, wie der ST5/ USA100 wurde in Kanada (Khanna et al. 2008) und auch der ST22 in Irland bei Schweinen bereits isoliert (Horgan et al. 2011). Auch Gibbons et al. (2013) konnten nachweisen, dass Schweine sich mit MRSA des CC5 infizieren können.

Sunde et al. (2012) konnten die Übertragung von MRSA des ST8, welcher auch bei den untersuchten Krankenhauspatienten vorkam, von norwegischen Landwirten auf ihre Schweine nachweisen. Somit bewiesen auch sie, dass eine gegenseitige Infektion möglich ist und auch andere ST, als der weitverbreitete ST398, auf Schweine übertragen werden können. Somit kann ein Austausch von Virulenzfaktoren unter den verschiedenen ST stattfinden und virulentere ST398 Isolate entstehen. In Italien waren Schweine im Schlachthof mit dem ST9, ST1/t127 und ST97 besiedelt (Battisti et al. 2010). Der ST1 und ST49 kommt häufig in italienischen Krankenhäusern vor und wurde auch in dieser Studie bei Schweinen aus der Schweiz nachgewiesen (Monaco et al. 2010, Overesch 2011), was die Übertragungsmöglichkeit von den Menschen auf die Schweine beweist und eine Rückübertragung virulenterer MRSA aus den Schweinebetrieben möglich macht.

In dieser Studie konnten insgesamt 3,6 % der Isolate von Krankenhauspatienten (n=5/140) dem CC398 zugeordnet werden, welcher unter den Isolaten aus den Schweinebetrieben dominiert. Diese Isolate des CC398 gehörten als CC398-V zu zwei kolonisierten (1,4 %) und einem invasiv befallenen Patienten (0,7 %) an. Außerdem kam bei einem Patienten mit MRSA in primär sterilem Material (0,7 %, n=1/140) der CC398 mit atypischer *SCC_{mec}* vor (0,7%). Auch in dem

Uniklinik Münster konnte bereits bei Patienten mit MRSA der CC398 nachgewiesen werden (Köck et al. 2009). Dies zeigt, genau wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass sich der LA-MRSA Klon CC398 schon bis in die deutschen Krankenhäuser ausgebreitet hat. Deshalb sollte, nach einem Aufnahmescreening aller Patienten mit Schweinekontakt und deren Angehörigen, eine Sanierung durchgeführt werden wobei auch von einer schnellen Rekontamination bei der Rückkehr in den Schweinebetrieb zu rechnen ist. Allerdings müsste auch eine Sanierung und Testung vor der Entlassung durchgeführt werden, um keine MRSA, welche neue Virulenzfaktoren im Krankenhaus von anderen MRSA aufgenommen haben in die Schweinebetriebe einzutragen.

Auch Van Belkum et al. (2008) fanden ein ST398 Isolat bei einem Krankenhauspatienten mit Wundinfektion. Dieses MRSA ST398 Isolat enthielt allerdings die *SCCmec*-III und war PVL-positiv. Dies zeigt aber, dass auch die *SCCmec*-III Kasette, die den HA-MRSA zugeordnet wird, beginnt sich unter den ST398 MRSA auszubreiten auch wenn sie in der vorliegenden Studie noch nicht zu finden war. Von Bedeutung ist, dass das PVL-Gen, welches durch horizontalen Gentransfer übertragen wird bereits den Weg in die deutschen Schweinebestände gefunden hat. In dieser Studie wurde zwar kein MRSA-Isolat aus einem Schweinebestand mit dem PVL-Gen isoliert, jedoch war ein MSSA-Isolat einer Sau PVL-positiv. Dies deutet auf den Beginn einer Ausbreitung PVL-positiver Isolate unter Schweinen sowie die daraus folgende Übertragung auf den Menschen hin. So könnte der PVL-Gen-positive ST398 bei Ausbreitung ein großes Risiko für den Menschen darstellen. Außerdem können MSSA oder MRSA des CC398 von HA-MRSA neben deren *SCCmec*-Kasette auch deren Virulenzfaktoren durch horizontalen Gentransfer erwerben, was zu einem neuen Risiko der Entstehung und Ausbreitung vermutlich virulenter CC398 Isolate führt, sobald es zu Kontakt zwischen den ST398 Isolaten der Schweine und anderen CA- oder HA-MRSA kommt, die ihre Virulenzfaktoren über MGE weitergeben.

Auch Yu et al. (2008) konnte ein PVL-positives MRSA-Isolat des ST398 bei einem Krankenhauspatienten nachweisen. Van Rijen et al. (2007) wiesen bei 31,5 % (n=23/73) der untersuchten MRSA von niederländischen Krankenhauspatienten den ST398 nach und die Prävalenz liegt damit über der von 3,6 % dieser Studie. Allerdings liegt das Uniklinikum Heidelberg nicht in einer Region mit einer hohen Schweinedichte, wie die untersuchten niederländischen Krankenhäuser, welche auch alle MRSA-Isolate einer Genotypisierung unterziehen, was zu Prävalenzunterschieden führen kann. Die Anzahl der Patienten mit ST398 in dieser Studie liegt jedoch über den Angaben des nationalen Referenzzentrums für

Staphylokokken von 2005 und 2006 mit Angaben von 0,3 % (n=16/5320), was zeigt, dass in den letzten Jahren die Prävalenz an MRSA des ST398 in deutschen Krankenhäusern angestiegen ist.

Voss et al. (2005) konnten bereits die Übertragung des ST398 von Schweinen auf einen Landwirten und von diesem auf eine Krankenschwester, sowie in einem Schweinebetrieb auf ein 6-Monate altes Kind, eines Bauern, nachweisen. Auch Lozano et al. (2011) wiesen in Spanien die Übertragung des ST398-V von Schweinen auf einen Landwirten nach und konnten den ST398 im Krankenhaus aus seiner Thoraxdrainage isolieren. Ekkelenkamp et al. (2006) beschrieben das Auftreten des ST398 bei einem Endokarditispatienten sowie Pan et al. (2009) bei einem Schweinebauern mit einem Abszess. Dies zeigt, dass auch gemäß der Ergebnisse dieser Studie bereits eine Einschleppung des ST398 in Krankenhäuser stattgefunden hat und der ST398 bei Menschen auch klinische Erkrankungen hervorruft.

Auch Golding et al. (2010) fanden MRSA des ST398 unter den untersuchten MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten aus Kanada. Allerdings lag die Prävalenz unter der dieser Studie und betrug 0,1 % (n=5/3687). In Kanada konnte nur der ST398-V nachgewiesen werden während in der vorliegenden Studie auch ein ST398 Isolat mit atypischer *SCCmec*-Kassette unter den Patienten nachzuweisen war, welcher bisher noch bei keinem anderen Patienten bekannterweise zu finden war und für die fortschreitende Selektion und Anpassung des ST398 spricht.

Auch unter allen Schweinealtersklassen war der CC398-V der am Häufigsten vorkommende Typ. Nur bei 14,5 % (n=6/62) der MRSA-Isolate von Absetzern trat der ST398 mit *SCCmec*-IV auf. Der CC398 mit atypischer *SCCmec* kam bei einem Ferkel, einer Sau und drei Absetzern vor. Unter den untersuchten Umgebungsisolaten kam nur der CC398 vor, der CC398-V dominierte und nur selten kam der CC398-IV sowie der CC398 mit atypischer *SCCmec*-Kassette vor. Diese Ergebnisse spiegeln die Dominanz des CC398 v.a. mit der *SCCmec*-V in den Schweinebeständen wieder, da er sich besonders gut an die Gegebenheiten in Schweinebetrieben angepasst hat. Dies geschah durch den Selektionsdruck aufgrund von Antibiotikagaben im Schweinebetrieb und durch den Erwerb verschiedener Resistenz-, Virulenzgene sowie *SCCmec*-Kassetten, die ihm ein Überleben im Schweinebetrieb ermöglichten (Price et al. 2012). Die hohe Übertragungsrate des ST398 zwischen Schweinen hat außerdem dazu beigetragen, dass eine schnelle Wirtsadaptation und Ausbreitung stattgefunden hat (Baquero et al. 2012).

Auch die Ergebnisse von Tenhagen et al. (2009) decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da von ihnen alle MRSA-Isolate aus Staubproben von deutschen Betrieben dem ST398 zugeordnet werden konnten. Davon gehörten, wie auch in dieser Studie, die meisten

Staubisolate mit 85 % zu dem CC398-V (n=129/152) und nur wenige zu dem CC398-III, der in der vorliegenden Studie bei keinem Isolat einer Umgebungsproben und auch keinem Schweine- sowie schweineassoziierten Menschenisolat nachgewiesen werden konnte. Auch Alt et al. (2011) fanden in Staubproben von deutschen Schweinebetrieben auch am häufigsten den ST398-V und seltener den ST398-IV. Köck et al. (2009) isolierten in NRW aus allen untersuchten Staubproben mit MRSA den ST398 und auch 18 % der Krankenhauspatienten (n=305/1695), die einem Screening auf MRSA durch Haut- oder Nasentupfer unterzogen wurden, vor der Einlieferung ins Krankenhaus, wiesen MRSA des ST398 auf. Die hohe Prävalenz zeigt, dass MRSA des ST398 in Gebieten mit einer hohen Schweinehaltungsdichte leicht in Krankenhäuser gelangen können und deshalb ein MRSA-Screening für Landwirte, Tierärzte und andere Personen mit Tierkontakt erfolgen sollte.

Die Isolate der Landwirte, Tierärzte und Studenten dieser Studie konnten zu insgesamt 87,8 % dem CC398-V zugeordnet werden und nur zwei Isolate dem CC398-IV (6,1 %). Huber et al. (2009) wiesen bei 50 % der MRSA-Isolate von Schweinetierärzten den ST398-IV (n=2/4), bei 25 % den ST398-V (n=1/4) und bei 25 % den ST8-IV (n=1/4) nach.

Da sich die Landwirte, Tierärzte und Studenten durch direkten Kontakt mit den Schweinen bzw. den Stallstaub mit MRSA des ST398 infizieren ist ein Screening im Krankenhaus vor Krankenhausaufenthalten durchzuführen und diese Personen bis zum Ergebnis zu isolieren, um die Mitpatienten und das Personal nicht zu gefährden. Die Ergebnisse zeigen somit, dass der ST398 von Schweinen und der Umgebung auf das Personal der Betriebe übertragen werden kann und auch wie Voss et al. (2005), Cuny et al. (2009) und Van Cleef et al. (2009) zeigten auf Familienmitglieder und andere Personen ohne Schweinekontakt, die es zu schützen gilt, da der ST398 auch zu klinischen Erscheinungen führen kann. Genauso muss nach einem Krankenhausaufenthalt die Übertragung von MRSA durch Landwirte und andere schweineassoziierte Personen auf die Schweine verhindert werden.

5.7 Virulenzfaktoren und wichtigen Gene zur Genotypisierung

5.7.1 Das Panton-Valentine Leukozidin (PVL-Gen)

Das PVL-Gen, welches als PVL-Zytotoxin zu Leukozytenzerstörung und Gewebnekrosen führt, konnte bei keinem der MRSA-Isolate von Schweinen, Tierärzten, Studenten, Landwirten oder Umgebungsproben, die alle dem CC398 angehörten, nachgewiesen werden. Dies weist auf

die derzeitige wahrscheinlich noch geringere Virulenz der MRSA des CC398 aus Schweinebetrieben, im Vergleich zu den MRSA der Krankenhauspatienten hin, da das PVL-Gen bereits bei 5,7 % (n=8/140) der untersuchten Isolate von Krankenhauspatienten in dieser Studie nachgewiesen werden konnte. Die PVL-Gen-positiven Krankenhauspatienten gehörten den CC80, CC88-MRSA-IV, CC5 sowie CC8 und ST8-MRSA-IV an, welche bei keinem schweineassoziierten Isolat dieser Studie vorkamen.

Der CC8 mit ST8-IV konnte allerdings bereits von Sunde et al. (2012) in Staubproben von einem Schweinebetrieb in Norwegen nachgewiesen werden und bei zwei Landwirten, die die Infektionsquelle für die Schweine darstellten. Dieser Stamm war zwar PVL-negativ allerdings kann der CC8, zu dem auch PVL-positive ST gehören, sich von infizierten Menschen auf Schweine ausbreiten und Virulenzfaktoren in die MRSA-Population der Schweinebestände eintragen. Auch Gibbons et al. (2013) konnten durch das Infizieren von Schweinen mit dem CC5 nachweisen, dass er sich unter ihnen ausbreitet. Eine Ausbreitung findet auch statt, falls der CC5 von Personen auf Schweine übertragen wird.

Die Übertragung des PVL-Gens kann durch horizontalen Gentransfer (z.B. durch den Bakteriophagen phiSLT), in das Genom der schon vorhandenen porcinen MSSA oder MRSA erfolgen (Boyle-Vavra et Daum 2007). Die Gefahr besteht besonders, da auch bei den Schweinen und schweineassoziierten Isolaten in dieser Studie, wie bei den bisher bekannten PVL-positiven CA-MRSA-Isolat, die *SCCmec*-Kassetten V und IV vorliegen, welche leicht das PVL-Gen aufnehmen können. Das PVL-Gen wurde jedoch bereits von Yu et al. (2008) bei dem ST398 von Krankenhauspatienten in China nachgewiesen, sowie auch von Welinder-Olsson et al. (2009) und von Van Belkum et al. (2009) bei ST398 Isolaten von Krankenhauspatienten. Jedoch stammten alle PVL-positiven ST398 Isolate bisher von Patienten ohne oder ohne wesentlichen Tierkontakt. Dies weist auf eine bestehende humanadaptiertere Subpopulation des ST398 hin (Wright et al. 1982, Baquero et al. 2012), welche durch die Aufnahme von Virulenzfaktoren virulenter werden könnte und sich auch auf Schweine übertragen ließe, mit der großen Gefahr einer Selektion im Schweinebetrieb und der Rückübertragung hochvirulenter ST398 auf den Menschen.

Jedoch ist in dieser Studie bereits auffällig, dass ein untersuchtes MSSA-Isolat einer Sau mit ST-211 bereits Träger des PVL-Gens war. Das Vorhandensein des PVL-Gens bei dem MSSA-Isolat in dieser Studie zeigt, dass es schon den Weg in deutsche Schweineherden gefunden hat und sich weiter ausbreiten kann. Der MSSA-ST211 gehört dem CC8 an, dessen Übertrag vom Menschen

auf das Schwein schon von Sunde et al. (2012) nachgewiesen wurde. Somit besteht die Möglichkeit der Weiterübertragung des PVL-Gens in Schweinebetrieben oder die Aufnahme einer *SCCmec*-Kassette durch die PVL-positiven MSSA, mit der Entstehung von PVL-positiven MRSA, in Schweinebetrieben. Kadlec et al. (2009) konnten in Deutschland noch bei keinem ST398 Isolat von Schweinen das PVL-Gen nachweisen, genauso wurde auch von Golding et al. (2010) das PVL-Gen bei keinem ST398 Isolat (n=5) von kanadischen Krankenhauspatienten nachgewiesen.

Durch die schnelle Übertragung der MRSA unter den Schweinen und den Selektionsdruck, aufgrund von Antibiotikagaben, könnten auch andere CC als der CC398 sich besser an Schweine anpassen, wie die CC5 oder CC8 oder der CC1 der CC49, welche bei den Schweizer Schweinen nachgewiesen wurden, vom Menschen stammen und von diesem übertragen wurden. Außerdem können die schon vorhandenen MRSA des CC398 in Schweinebetrieben durch neue MRSA-ST neue Virulenzfaktoren erwerben und später zur Rückübertragung von MRSA des ST398 vom Schwein oder Staub auf den Menschen führen, was ein Risiko für die Verbreitung in der Bevölkerung darstellt. Genauso besteht wiederum die Gefahr der Aufnahme neuer Virulenzfaktoren außerhalb von Schweinebetrieben und der Einschleppung vermutlich noch virulenterer MRSA des ST398 mit neuen Virulenzgenen in Schweinebetriebe.

5.7.2 Das Gamma-Hämolysin, Alpha-Hämolysin, Beta-Hämolysin (Shingomyelase C) und Delta-Hämolysin (*hlg*-, *hla*-, *hly*- und *hld*-Gen)

Das Gamma-Hämolysin-Gen konnte in der vorliegenden Studie sowohl bei 87,1 % der Krankenhauspatienten- (n=122/140), 82,6 % der Schweine- (109/132), 48,5 % der schweineassoziierten Menschen- (n=16/33) und 57,5% der Umgebungsprobenisolate (n=19/33) nachgewiesen werden. Es führt zur Leukozyten- und Erythrozytenzerstörung durch Porenbildung. Auffällig ist, dass das Alpha-, Beta- und Delta-Hämolysin-Gen bei Isolaten von über 80 % der Krankenhauspatienten nachgewiesen werden konnte und auch das Alpha-Hämolysin-Gen bei 90,9 % der Schweine-, 69,7 % der schweineassoziierten Menschen- und 78,8 % der Umgebungsprobenisolate vorkam. Auch das Delta-Hämolysin-Gen konnte bei 100 % der Schweine-, 97 % der schweineassoziierten Menschen- und 97 % der Umgebungsprobenisolate in dieser Studie nachgewiesen werden. Allerdings kam das Beta-Hämolysin-Gen, im Gegensatz zu

den Krankenhausisolaten, bei keinem Schweineisolat und nur bei jeweils 6,1 % der Isolate von schweineassoziierten Menschen und Umgebungsproben vor.

Noch weniger Hämolysin-Gene konnten Kadlec et al. (2009) bei allen untersuchten deutschen ST398 Isolaten von Schweinen nachweisen, da von ihnen nur das Gamma- sowie Alpha-Hämolysin-Gen nachgewiesen werden konnte.

Die Virulenz von beta-Hämolysin-Gen-positiven-MRSA ist höher, wie Katayama et al. (2013) nachweisen konnten, da neben der Erythrozytolyse noch eine erhöhte Kolonisationsfähigkeit besteht sowie eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber von Keratinozyten. Das Fehlen des beta-Hämolysin-Gens kann als eine der möglichen Ursachen angesehen werden, warum bei Schweinen meistens nur eine Kolonisation vorliegt aber keine klinischen Erscheinungen wie Haut- und Wundinfektionen vorkommen. Allerdings zeigen die positiven Isolate aus der Umgebung und der schweineassoziierten Menschen, dass das Gen sich bereits durch horizontalen Gentransfer in der CC398 Population auszubreiten beginnt. Auffällig ist auch, dass unter den CC398 Isolaten der Krankenhauspatienten bereits ein Isolat eines Patienten, mit MRSA in primär sterilem Material, mit Beta-Hämolysin-Gen vorkam, was zeigt, dass auch dieses Gen bereits seinen Weg in die CC398 Population gefunden hat und jederzeit durch horizontalen Gentransfer auf MRSA des CC398 von Schweinen übertragen werden kann.

Die Mehrzahl der bisher untersuchten ST398 Isolate aus anderen Studien trugen als einzige Virulenzfaktoren die Hämolysin-Gene und nur selten andere Virulenzgene, welche in der vorliegenden Studie bereits entdeckt wurden und auf eine vermutlich erhöhte Virulenz hinweisen (Monecke et al. 2007, Monecke et al. 2008b).

5.7.3 Die *SCCmec* und die „Cassetten Chromosom Recombinase Gene“ (*ccr*-Gene)

In der vorliegenden Studie konnten 88,9 % der Isolate von Schweinen (n=112/126), 93,5 % der schweineassoziierten Menschen (n=29/31) und 80 % der Umgebungsproben (n=24/30), von denen die *SCCmec* zuzuordnen war, dem ST398-V zugeordnet werden. Nur 7,1 % der Isolate von Schweinen, 6,4 % der schweineassoziierten Menschen und 16,7 % der Umgebungsproben gehörten dem *SCCmec*-IV an. Außerdem konnten 4 % der Schweine- und 6,7 % der Umgebungsprobenisolate einem ST398 mit atypischer *SCCmec*-Kassette zugeordnet werden. Über diese Verteilung der *SCCmec*-Kassetten des ST398 mit häufiger *SCCmec*-V und nur seltener

Zugehörigkeit zu den ST398-IV wurde auch von Kadlec et al. (2009) und Golding et al. (2010) berichtet. Auch Schijffelen et al. (2007) fanden unter allen ST398 aus Nasentupfern deutscher Schweine den ST398-V und nur bei einem Isolat den ST398-IV.

Unter den Krankenhauspatienten von denen der ST und die *SCCmec* ermittelt werden konnte kamen zu 60,0 % HA-MRSA (n=78/130) mit den *SCCmec*-I, -II und -III, sowie zu 42,3 % CA-MRSA mit der *SCCmec*-IV und -V vor. Darunter waren, unter den Isolaten von Krankenhauspatienten mit auswertbarer *SCCmec*, drei LA-MRSA mit der *SCCmec*-V und ein ST398 mit einer atypischen *SCCmec*. Besonders zu beachten ist, dass die *SCCmec*-IV und -V, die bei den schweineassoziierten MRSA dominieren, bei CA-MRSA vorkommen und diese *SCCmec*-Kassetten sehr klein sind, sodass das Methicillin-Resistenz Gen von ihnen besonders gut an MSSA weitergegeben wird (Ma et al. 2002, Vandenesch et al. 2003). Außerdem leiden die *SCCmec*-Typen-IV und -V nicht unter einer verminderten Replikationsrate, wie die HA-MRSA, was wiederum ihre schnelle Ausbreitung und die hohe Prävalenz in den Schweinebetrieben erklärt (Daum et al. 2002, Ito et al. 2004, Monecke et al. 2008, Lee et al. 2007).

Der *SCCmec*-Typ-IV und -V, sowie das PVL-Gen lassen sich mit CA-MRSA weltweit assoziieren und so wurde in der vorliegenden Studie auch schon ein MSSA-Isolat einer Sau gefunden das PVL-positiv war (Vandenesch et al. 2003). Dies zeigt, dass auch MSSA des ST398 das PVL-Gen erwerben können, durch horizontalen Gentransfer und auch weiter in der Lage sind das *mecA*-Gen aufzunehmen und somit zu MRSA zu werden. Des Weiteren besteht das Risiko der Entstehung von PVL-positiven Schweinen, da der *SCCmec*-IV in Schweinebetrieben schon vorhanden ist, welcher besonders gut in der Lage ist das PVL-Gen aufzunehmen auch wenn er bisher weitaus seltener vorkommt als der *SCCmec*-V.

Die *SCCmec*-V sind Träger des *crr*-Genkomplexes (cassetten chromosom recombinase), der aus *crr*-Genen besteht, die für die Rekombinationsvorgänge, also die Integration und Exzision, der *SCCmec*-Kassette in und aus dem Genom heraus, verantwortlich sind (Katayama et al. 2000). Dies konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, da das *crrC*-Gen bei 93,9 % der Schweine (n=124/132), 93,9 % der schweineassoziierten Menschen- (n=31/33) und 78,8 % der Umgebungsprobenisolate (26/33) nachzuweisen war und die *SCCmec*-V unter diesen ST398 Isolaten dominierte. Alle *SCCmec*-V trugen das *crrC*-Gen und unter den Schweinen waren noch drei Isolate zusätzlich auch Träger des *crrA1*-Gens, zwei des *crrA2*-Gens und eines des *crrA3*-Gens. Auch unter den Umgebungsproben kamen drei ST398-V Isolate vor, die noch das *crrA1*-Gen trugen. Alle ST398-IV Isolate in der vorliegenden Studie trugen das *crrA2*- sowie *crrB2*-Gen

wie auch von Ito et al. (2001), Oliveira et al. (2001), Ma et al (2002), Ito et al. (2004) beschrieben wurde. Die atypischen Isolate waren Träger des *ccrC*-Gens bei vier Schweinen, des *ccrA2*- mit *ccrB2*-Gens bei einem Schwein sowie des *ccrA4*- mit *ccrB4*-Gens bei einer Staubprobe und einer Kette und das Vorkommen einer atypischen *SCCmec*, wie in der vorliegenden Studie, bei dem ST398 wurde bisher bei Schweinen noch nicht näher beschrieben.

Auch das seltene Vorkommen des *ccrA1*- bei nur 0,7 % der Patienten (n=1/140) und des *ccrA2*-Gens bei 1,4 % der Patienten (n=2/140) spiegelt sich in dem Vorhandensein von nur einem HA-MRSA-Isolat eines Krankenhauspatienten mit der *SCCmec*-I wieder, welche sich aus den *ccrA1*- und *ccrA2*-Genen zusammensetzt und codiert wird. Auch das Dominieren der *ccrA2*- und *ccrB2* Gene zeigt sich im dominierenden Auftreten der *SCCmec*-Typen -II und -IV, unter den Krankenhauspatienten, welche von diesen Genen codiert werden (Kondo et al. 2006).

5.7.4 Die Accessory-Gen-Regulator-Gene (*agr*-Gen)

In der vorliegenden Studie konnte unter den schweineassoziierten ST398 Isolaten nur das *agr*-I-Gen nachgewiesen werden, während bei den Krankenhauspatienten neben dem *agr*-I-Gen auch das *agr*-II- und *agr*-III-Gen vorkamen.

Bei LA-MRSA des ST398 konnte bisher, wie bereits von anderen Autoren beschrieben wurde, nur das *agr*-I-Gen nachgewiesen werden (Kadlec et al. 2009, Köck et al. 2009, Lozano et al. 2011), welches zur Regulation der Virulenzfaktoren dient und zunächst die Faktoren der Oberflächenanheftung und später die Faktoren zur Toxin- und Enzymproduktion, Ernährung und der Umgehung des Immunsystems steigert. Wahrscheinlich beruht das alleinige Vorkommen des *agr*-I-Gens auf einem möglichen selektiven Vorteil von ST398 mit *agr*-Gruppe I (Sakoulas et al. 2003). Das *agr*-I- und -II-Gen korreliert häufig mit einer intermediären Glycopeptid-Resistenz, welche das gehäufte Vorkommen des *agr*-I-Gens unter den Schweinen erklären könnte, mit dem Selektionsvorteil der ST398 unter Schweinen (Sakoulas et al. 2002, Verdier 2004, Moise-Broder et al. 2004).

Auch in dieser Studie kam das *agr*-III-Gen, wie zuvor bereits von verschiedenen Autoren berichtet wurde, nur bei CA-MRSA vor (Ji et al. 1997, Dufour et al. 2002, Pearman et al. 2002, Naimi et al. 2003, Vandenesch et al. 2003).

5.7.5 Potassium-translocating ATPase A und B (*kdpA*-, *kdpB*-Gen)

Die “Potassium-translocating ATPase A- und B-Gene“ konnten in der vorliegenden Studie nur bei MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten nachgewiesen werden. Das ATPase A-Gen kam bei 57,9 % (n=81/140) der Patienten und das ATPase B-Gen bei 50,7 (n=71/140) der Krankenhauspatienten vor. Sie konnten jedoch bei keinem schweineassoziierten MRSA-Isolat nachgewiesen werden und wurden auch zuvor noch nicht bei schweineassoziierten Isolaten zur Energiegewinnung beschrieben.

5.7.6 Leukocidin D und E (*lukD*-, *lukE*-Gen)

In dieser Studie konnte das *lukD*-Gen bei 81,4 % der Krankenhauspatienten- (n=114/140) und nur bei 3,0 % (jeweils n=1/33) der schweineassoziierten Menschen- und Umgebungsprobenisolaten nachgewiesen werden. Das *lukE*-Gen kam bei 80,7 % der Patienten (n=113/140) aber keinem schweineassoziierten Isolat vor. Auch Havaei et al. (2010) konnte bei 73,8 % (n=110/149) der untersuchten MRSA-Isolate, aus dem Universitätsklinikum Teheran, das *lukD* und -E-Gen nachweisen. In Studien von Kadlec et al. (2009) und Arguidin et al. (2011) konnten die beiden Leukocidine, die v.a. zu Hautinfektionen und Abszessen führen, nicht bei dem ST398 aus Schweinebetrieben nachgewiesen werden.

Dies zeigt die noch vermutlich etwas geringere Virulenz des ST398 von Schweinen, da er bisher noch keine Leukocidin-D und -E erwerben konnte, über horizontalen Gentransfer v.a. von HA-MRSA. Auch das Fehlen des *lukD*- und *lukE*-Gens bei MRSA des ST398 von Schweinen ist eine Ursache warum die Schweine meistens keine klinischen Erscheinungen zeigen, sondern nur nasal besiedelt sind. Allerdings konnte das *lukD*-Gen bereits bei 3% der MRSA-Isolate von schweineassoziierten Menschen und Umgebungsproben nachgewiesen werden, was den Eintrag des Gens in die ST398 Population beweist.

Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die beiden Leukozidine vermehrt bei HA-MRSA des CC5 und CC8. Somit kann der ST398 von diesen neue Virulenzgene durch horizontalen Gentransfer erwerben (Novick et al. 2007, Arguidin et al. 2011). Allerdings ist zu beachten, dass bereits eine Umgebungsisolat und ein Isolat eines Studenten *lukD*-Gen-positiv waren und somit der ST398 bereits in der Lage war diese Gene zu erwerben und die Leukocidin-positiven ST398 Isolate sich folglich auch im Schweinebetrieb ausbreiten und auch auf den Menschen zurückübertragen werden können.

5.7.7 Staphylokinase (*sak*-Gen), Chemotaxis-inhibiting Protein (*chp*-Gen) und Staphylococcal Complement Inhibitor (*scn*-Gen)

In dieser Studie konnte das *sak*-Gen nur bei 92,1 % (n=129/140) der MRSA von Krankenhauspatienten nachgewiesen werden, allerdings bei keinem ST398 Isolat von Schweinen, schweineassoziierten Menschen oder der Umgebung. Ebenfalls kam das *chp*-Gen nur bei den Krankenhauspatienten vor (74,3 %, n=104/140).

Besonders auffällig ist, dass das *scn*-Gen neben den MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten (83,6 %, n=117/140) auch bei 3 % der ST398 Isolate von schweineassoziierten Menschen, also einer Studentin und 3 % der Umgebungsproben, also einer Staubprobe vorkam (jeweils n=1/33), welche nicht zu den gleichen Betrieb gehörten und beide auch Beta-Hämolysin-Gen positiv waren. Alle deutschen MRSA-Isolate von Schweinen, die Kadlec et al. (2009) untersuchten waren kein Träger des *scn*-Gens und auch die ST398 Isolate vom Arguidin et al. (2011) waren *scn*-Gen-negativ.

Die Gefahr besteht darin, dass das *scn*-Gen es schafft sich unter den porcinen ST398 auszubreiten und wieder auf den Menschen übertragen zu werden, sodass es zu einer Ausbreitung in der Bevölkerung kommt. Das Vorhandensein des MRSA-Isolates einer Staubprobe mit *scn*-Gen zeigt, dass der CC398 längst in der Lage war neue Virulenzgene zu erwerben und dabei ist seine Virulenz vermutlich immer weiter zu steigern, über horizontalen Gentransfer von CA- oder HA-MRSA. Deshalb sollten Landwirte und Tierärzte bei ihrer Entlassung auf MRSA getestet werden, um den Eintrag von MRSA des ST398 und anderen ST, mit neuen Virulenzfaktoren, in Schweinebetriebe zu verhindern.

5.7.8 Collagen-binding Adhesin (*cna*-Gen)

Das Collagen-binding Adhesin-Gen, welches für die Kolonisation und die frühen Stadien der Infektion verantwortlich ist, konnte mit dem *cna*-Gen in der vorliegenden Studie bei allen ST398 Isolaten von Schweinen, schweineassoziierten Menschen und Umgebungsproben nachgewiesen werden. Allerdings kam es nur bei 25,7 % der Krankenhauspatienten (n=36/140) vor, die auch dem CC398, sowie den CC22, CC5, CC1, CC6, CC45 und CC8 angehörten. Sein Vorkommen unter den untersuchten Gruppen ist hochsignifikant (p<0,001). Besonders auffällig ist, dass das *cna*-Gen, als einziges untersuchtes Gen, bei allen schweineassoziierten Isolaten gefunden wurde aber nur bei einer geringen Anzahl an MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten. Unter allen

fünf CC398 Isolaten der Krankenhauspatienten konnte jedoch auch das *cna*-Gen nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den CC398 Isolaten der Krankenhauspatienten auch, um die gleiche CC398 Population wie bei den schweineassoziierten Isolaten oder um eine humanadaptierte Subpopulation des CC398 handelt, die sowohl Menschen als auch Schweine befallen kann.

Somit könnte das *cna*-Gen maßgeblich an der Ausbreitung des ST398 unter Schweinen verantwortlich sein und den MRSA des ST398 eine hohe Bindungsaffinität zu porcinem Kollagen verleihen. Auch McCarthy et al. (2010) gehen davon aus, dass die MSCRAMMs wie das *cna*-Gen an der Wirtsspezifität beteiligt sind. Das *cna*-Gen könnte somit ein entscheidender Faktor für die Ausbreitung der ST398 unter den Schweinen sein aufgrund der guten Bindungsaffinität zu Schweinekollagen, was die Kolonisation der Schweinenasen begünstigt.

Auch Kadlec et al. (2009) konnten bei allen deutschen porcinen MRSA-Isolaten des ST398 das *cna*-Gen isolieren, jedoch ohne Vergleich zu humanen MRSA. Auch Atshan et al. (2011) wiesen bei nur 28 % der untersuchten humanen MRSA-Isolate das *cna*-Gen nach, jedoch erfolgte kein Vergleich zu porcinen MRSA.

Das geringere Vorkommen des *cna*-Gens, welches über das Collagen-binding Adhesin an der Kolonisation und der frühen Infektion beteiligt ist, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die humanen MRSA-Isolate über viel mehr Virulenzfaktoren verfügen, welche eine Kolonisation und Infektion möglich machen, als die LA-MRSA des ST398, bei denen bisher häufig nur Hämolysin-Gene nachgewiesen wurden.

Allerdings könnte die Expression des *cna*-Gens auch noch von den CC abhängig sein, wie Atshan et al. (2011) vermuten, sodass manche CC das *cna*-Gen exprimieren wie der CC398 und andere nicht. Diese Annahme stimmt auch mit den Ergebnissen dieser Studie überein, da das *cna*-Gen bei allen Isolaten des CC398, CC45 (*agr*-I), CC5, CC22, CC1, CC8 (ST239) und CC6 vorhanden war und bei den CC8, CC80 sowie CC80 (ST72) und CC97 fehlte. Die einzige Ausnahme stellte der CC5 dar, da sowohl 4,5 % der analysierten Isolate das *cna*-Gen enthielten und es bei 95,5 % der CC5 Isolate fehlte. Der ST dieses CC5 Komplexes mit gespaltenem *cna*-Gen Vorkommen war der ST5/ST225-MRSA-II, Rhein-Hessen-Stamm. Das Vorkommen des *cna*-Gens bei dem ST398 könnte ein Grund sein, warum sich der ST398 sehr gut an die Schweine angepasst hat und mit dem Kollagen-binding-adhesin an Schweinekollagen in der Schweinenase anheften kann und deshalb zu einer besseren Kolonisation der Schweine- als Menschennasen beiträgt.

5.7.9 Fibrinogenbindungs-Protein (*fib*-Gen, *fib*-19kDa)

In dieser Studie konnte das Fibrinogenbindungs-Protein-Gen, welches der Adhäsion von *S. aureus* dient, bei 81,4 % (n=114/140) der Krankenhauspatienten, unter denen die CC5, CC1, CC8, CC6, CC80 und CC97 vorkamen, isoliert werden. Allerdings kam es bei keinem Isolat von Schweinen, schweineassoziierten Menschen oder der Umgebung vor.

Auch Monecke et al. (2008b) konnte durch Genotypisierung mittels Microarray kein *fib*-Gen bei dem ST398 nachweisen und auch in der Studie von Kadlec et al. (2009) fehlte es zur Oberflächenhaftung. Palma et al. (1996) gehen davon aus das das Vorhandensein des *fib*-Gens zu einer verstärkten Virulenz führt, da Fibrinogen in hohem Maße in Wunden vorliegt und es durch MRSA mit dem *fib*-Gen verstärkt zu schlecht heilenden Wunden kommt. Das Fehlen des *fib*-Gens kann ein Grund dafür sein, warum LA-MRSA bisher nur selten zu klinischen Erscheinungen führten und bei Schweinen kaum klinische Erkrankungen durch MRSA des ST398, wie Haut- und Wundinfektionen beschrieben wurden. Die Aufnahme des *fib*-Gens durch den ST398 von HA- oder CA-MRSA über MGE ist möglich, weshalb Menschen mit Schweinekontakt nach einem Krankenhausaufenthalt wiederum auf MRSA getestet werden sollten, um eine Ansteckung ihrer Schweine und der Rückübertragung dieser vermutlich virulenteren MRSA mit dem *fib*-Gen auf andere Personen entgegenzuwirken.

5.7.10 Fibronectinbindendes Protein (*fnbA*- und *fnbB*-Gen)

In der vorliegenden Studie konnte das Fibronectinbindende Protein-A-Gen bei allen Isolaten von Krankenhauspatienten (n=140/140), 93,9 % der Schweine (n=124/132), 69,7 % der schweineassoziierten Menschen und 69,7 % der Umgebungsproben (je n=23/33) nachgewiesen werden. Das fibronectinbindende Protein-B-Gen trat bei 85 % der Patienten-, 98,5 % der Schweine- 97 % der schweineassoziierten Menschen- und 90,9 % der Umgebungsprobenisolate auf. Auch Kadlec et al. (2009) konnten die *fnbA*- und *fnbB*-Gene, zur Anheftung, unter den ST398 Isolaten deutscher Schweine isolieren. Dies zeigt, dass sie zusammen mit dem *cna*-Gen wichtige Faktoren der Oberflächenanheftung von ST398 darstellen.

5.7.11 Das *Staphylococcus aureus* Oberflächenprotein G (*sasG*-Gen)

In der vorliegenden Studie trat das Gen des *S. aureus* Oberflächenprotein-G, welches über das *S. aureus* Oberflächenprotein-G zur Kolonisation beiträgt durch die Adhäsion an Nasenepithelzellen und somit die Biofilmbildung unterstützt (Roche et al. 2003, Geoghegan et al. 2010), zwar bei 95,7 % der Krankenhauspatienten- (n=134/140) jedoch nur bei 15,2 % der Schweine- (n=20/132), 3 % der schweineassoziierten Menschen- (n=1/33) und 6,1 % der Umgebungsprobenisolate (n=2/33) auf. Die negativen Krankenhauspatienten gehörten den CC398 (n=4/5) und dem CC45 (*agr*-I) (n=2/2) an. Da die anderen CC der Krankenhauspatienten alle *sasG*-Gen-positiv waren, gibt es eine Verbindung des CC und des *sasG*-Status. Die einzige Ausnahme stellte der CC398 unter den Krankenhauspatienten dar, da ein *sasG*-Gen-positives Isolat und vier negative Isolate vorlagen was wiederum auf das Vorhandensein von humanadaptierteren Subpopulationen des CC398 hinweist. Während in den Studien von Kadlec et al. (2009) und Jamrozcy et al. (2012) kein MRSA-Isolat des ST398 Träger des *sasG*-Gens war, ist besonders hervorzuheben, dass es in der vorliegenden Studie bereits bei Schweine-, schweineassoziierten Menschen- und einem Umgebungsisolat nachgewiesen werden konnte. Somit muss eine Übertragung des *sasG*-Gens über horizontalen Gentransfer von *sasG*-positiven MRSA-Isolaten auf den ST398 stattgefunden haben. Dies zeigt, dass die schweineassoziierten MRSA des ST398 vermutlich bereits virulenter sind und über eine bessere Biofilmbildung verfügen, durch einen weiteren Virulenzfaktor der ihre Kolonisation durch Anheftung am Nasenepithel verstärkt. Außerdem zeigt die vorliegende Studie, dass das *S. aureus* Oberflächenprotein-G nicht nur zur Anheftung an humane Nasenepithelzellen dient, sondern sich auch an Schweinenasenepithelzellen angepasst hat, durch das vermehrte *sasG*-Gen Vorkommen.

5.7.12 Clumping-Faktor (*clfA*- und *clfB*-Gen) und Kapsel

Das Clumping Faktor A- und B-Gen, welches über den Clumping Faktor zur Oberflächenanheftung und –besiedelung, durch Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin führt, konnte bei allen untersuchten Isolaten nachgewiesen werden. Auch Monecke et al. (2008b) konnte bei allen mittels Microarray untersuchten ST398 Isolaten die *clfA*- und *clfB*-Gene identifizieren. Heiman et al. (2008) konnten nachweisen, dass der Clumping-Faktor-B besonders wichtig ist bei der nasalen Kolonisation und somit steht das Vorhandensein des *clfB*-Gens bei allen Isolaten des ST398 in direktem Zusammenhang mit der hohen Kolonisationsfähigkeit der

ST398 v.a. zusammen mit der gleichzeitigen Anwesenheit des *cna*-Gens. Somit wäre der *clfB* auch als ein möglicher Angriffspunkt zu wählen bei Dekolonisationsstrategien für den ST398.

Alle schweineassoziierten Isolate und 92,1 % der MRSA-Isolate von Krankenhauspatienten (n=129 /140) wurden dem Kapseltyp-5 zugeordnet. Auch bei bisherigen Analysen des ST398 wurden die Gene des Kapseltyps-5 nachgewiesen (Bardiau et al. 2013, Camoez et al. 2012).

5.7.13 Die Enterotoxine (*sea-sej*-Gen) und das Toxik-Schock-Syndrom-Toxin (*tst1*-Gen)

In der vorliegenden Studie konnte bei den MRSA-Isolaten von Schweinen die Enterotoxingene *sea* (0,76 %, n=1/132), *sea320* (2,3 %), *sed* (10,6 %), *seg* (2,3 %) und *sej* (1,5 %) nachgewiesen werden. Auch bei den schweineassoziierten MRSA-Isolaten von Menschen kamen die *sea320*-, *sed*-, *sef*-, *seg*-Gene vor genauso wie bei den Umgebungsproben (alle unter 10 %). Währenddessen kamen bei den Krankenhauspatienten insgesamt bemessen, außer das Enterotoxingen *sea320* und das Enterotoxingen E (*sef*-Gen), alle existierenden Enterotoxingene vor. Selten wurde bereits über das Vorkommen der Enterotoxingene *seb*, *sek*, *seq*, *sed* und *seg* in deutschen oder französischen ST398 Isolaten berichtet (Kadlec et al. 2009, Laurent et al. 2009). Arguidin et al. (2011) fanden das *seb*-Gen in niederländischen ST398-Isolaten.

Das Auftreten der bisher neuen Enterotoxingene-A und -J aus porcinen MRSA-Isolaten und des Enterotoxingens-E aus Isolaten von Umgebungsproben und schweineassoziierten Menschen zeigt, dass es dem ST398 gelungen ist über MGE bereits neue Enterotoxingene, wie in dieser Studie beschrieben wurde zu erwerben. Das Enterotoxin A führt zu Erbrechen, mit oder ohne Diarrhoe und dem „Staphylococcal food poisoning“ (SFP), welches somit auch über infizierte Schweine übertragen werden kann und ein Risiko für die Bevölkerung darstellt. Deshalb sollte jede Kontaktquelle für Landwirte und Tierärzte zu HA- und CA-MRSA unterbunden werden und ein Screening dieser Personen nach einem Krankenhausaufenthalt durchgeführt werden.

Das *tst1*-Gen, konnte zwar nur bei wenigen Krankenhauspatienten mit CC22-MRSA-IV (*tst1*+) und CC5 nachgewiesen werden, allerdings trat auch bei einem Schweineisolat das *tst1*-Gen auf. Dies zeigt, dass der ST398 Kontakt zu MGE hatte, die als Überträger des *tst1*-Gens, von HA- oder CA-MRSA aus, fungierten. So kann das *tst1*-Gen als Virulenzgen in das Genom des ST398 eingebaut werden, was sich auch bereits ereignet hat.

Bisher konnte es bekannterweise bei keinem porcinen ST398 Isolat identifiziert werden (Kadlec et al. 2009, Arguidin et al. 2011) und trat in der vorliegenden Studie erstmals bei einem Schwein auf. Auch bei den analysierten MSSA-Isolaten in dieser Studie trat das *tsf1*-Gen bei den CC398-MSSA und ST211-MSSA unterschiedlicher Betriebe auf, was zeigt, dass es bereits öfters den Weg in deutsche Schweinebestände gefunden hat und auch von den MSSA auf MRSA übertragen werden könnte.

5.7.14 Staphylococcen Superantigen-like Proteine 1-11 (*ssl1-11-Gen*)

In dieser Studie konnten unter den Krankenhauspatienten alle mit dem Microarray analysierbaren Gene *ssl1-11*, welche der Umgehung des Immunsystems dienen, nachgewiesen werden. Bei den Schweineisolaten konnte das *ssl1*-, *ssl3*-, *ssl5*- und *ssl10*-Gen und bei den Isolaten von schweineassoziierten Menschen und den Umgebungsproben die Gene *ssl1*, *ssl3* und *ssl10* gefunden werden. Besonders auffällig ist, dass das *ssl1*-Gen bei 100 % der Schweineisolate (n=132/132) aber nur bei 80 % (n=112/140) der Krankenhauspatienten vorkam, während die anderen Superantigen-like Protein-Gene weitaus häufiger unter den Patientenisolaten vertreten waren. Auch Deepa et al. (2010) zeigten bereits, dass das Staphylococcen Superantigen-like Protein-10 fähig ist an die IgG aus Schweineblut zu binden und somit die Phagozytose zu verhindert. Das Vorkommen der Ssl bei dem ST398 ist eine weitere Ursache warum die MRSA nicht von dem Immunsystem der Schweine erkannt werden und sich immer weiter in den Schweinebetrieben ausbreiten können. Außerdem sind viele Ssl wie Deepa et al. (2010) nachgewiesen haben, sowohl in der Lage das Immunsystem des Menschen, als auch das von Schweinen und anderen Säugern zu umgehen. Außerdem kann der ST398 über MGE von anderen MRSA, weitere *ssl-Gene* als nur die Gene *ssl1*, -3, -5 und *ssl10* erwerben. Dies ist auch offensichtlich bereits geschehen, wie auch bei anderen Virulenzgenen in dieser Studie bereits beschrieben wurde. In bisher veröffentlichten Studien konnten noch keine *ssl1*, -3, -5 und -10-Gene bei Schweineisolaten, mit dem ST398 oder anderen schweineassoziierten Isolaten, nachgewiesen werden. Außerdem trug ein invasiver Patient mit ST398 auch noch das *ssl9*-Gen und hat dieses offensichtlich bereits von einem HA- oder CA-MRSA im Krankenhaus über MGE erworben. Somit kann dieses ST398 Isolat, wie auch die ST398 Isolate aus den Schweinebetrieben, welche bereits ssl-Gene erworben haben, besser das Immunsystem umgehen und sind somit vermutlich virulenter als die bisher beschriebenen ST398-MRSA-Isolate.

5.7.15 Vergleichende Darstellung der Virulenzfaktoren des ST398 aus Schweinebetrieben mit anderen MRSA sowie die Entwicklung der Aufnahme von neuen Virulenzfaktoren seit dem Jahr 2005

Im Vergleich der Virulenzfaktoren des ST398 von Schweinen mit den anderen MRSA der Krankenhauspatienten sticht hervor, dass der ST398 von Schweinen, schweineassoziierten Menschen und aus der Umgebung der Schweine weniger Virulenzgene aufweist.

Bei den Schweinen mit MRSA des ST398 konnte in der vorliegenden Studie das Alpha-, Gamma- und Delta-Hämolysin-Gen, das *agr*-I-Gen, das *clf*-A- und -B-Gen, das *fnbA*- und -B-Gen, das *cna*-Gen und die Enterotoxingene-D und -G identifiziert werden, welche auch schon seit der Entdeckung im Jahre 2005, bei Schweinen mit dem ST398 beschrieben wurden (Monecke et al. 2007, Monecke et al. 2008, Kadlec et al. 2009, Köck et al. 2009, Laurent et al. 2009, Lozano et al. 2011).

Das Auftreten des *sasG*-Gens, des *tsf*-Gens, der Staphylococcen-superantigen like Protein-Gene und der Enterotoxingene-A und -J, bei dem ST398 von Schweinen wurde erstmals in dieser Studie mit dem Microarray nachgewiesen.

Des Weiteren traten, neben den bei den Schweinen identifizierten Genen, bei den schweineassoziierten Menschen- und den Umgebungsprobenisolaten noch das *scn*-Gen, das *lukD*-Gen und das Beta-Hämolysin-Gen auf. Bei den schweineassoziierten Menschen- und den Umgebungsisolaten mit dem ST398 fehlten allerdings im Gegensatz zu den ST398-Isolaten von Schweinen die Enterotoxingene *sea* und *sej* sowie das *ssl5*-Gen.

Im Vergleich zu den ST398 der Schweine traten bei den untersuchten MRSA der Krankenhauspatienten als weitere Virulenzgene noch das Beta-Hämolysin-Gen, das *agr*-II- und *agr*-III-Gen, die Gene *kdpA*, *kdpB*, *lukD* und *lukE*, die Gene *ssl2*, -4, -6, -7, -8, -9, -11, alle Enterotoxingene außer das *entG*-Gen, die Gene des IEC *sak*, *scn*, und *chp*, das *fib*-Gen sowie das PVL-Gen auf.

Das Auftreten der Virulenzgene bei den Schweine- und den anderen CA- und HA-MRSA-Isolaten der Krankenhauspatienten des Universitätsklinikums Heidelberg wird in der Abbildung 52 dargestellt.

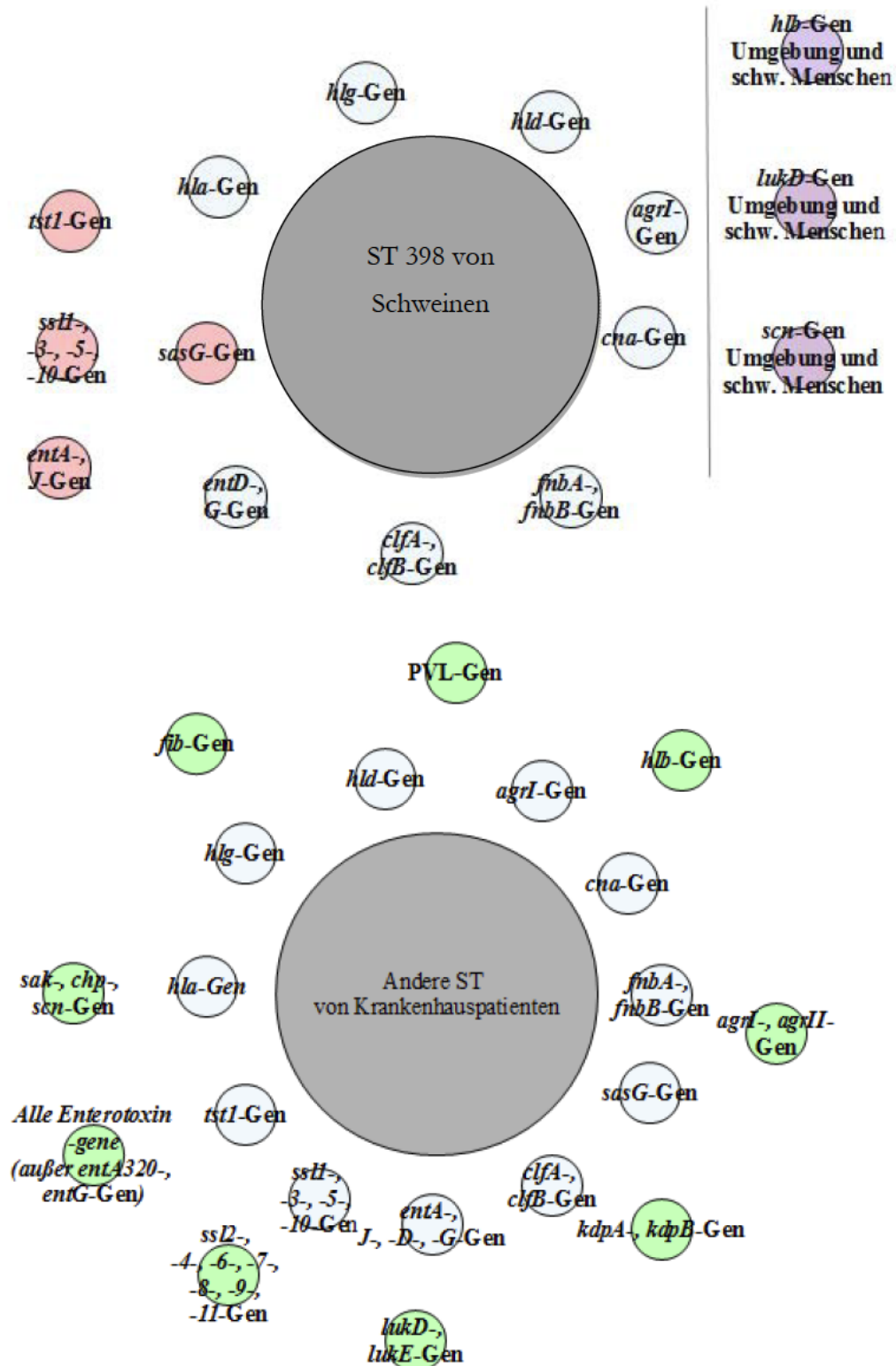


Abbildung 52: Vergleichende Darstellung der Virulenzgene des ST398 mit anderen ST von MRSA der untersuchten Krankenhauspatienten.

Die Virulenzgene (kleine Kreise) welche den ST398 bzw. die anderen ST umgeben (große graue Kreise) kommen bei diesen vor.

ST398: Die in blau markierten Virulenzgene des ST398 wurden in dieser Studie nachgewiesen und wurden auch schon zuvor bei MRSA des ST398 beschrieben. Die rot markierten Virulenzgene sind neu. Die lila markierten Virulenzgene kamen bei Isolaten von Umgebungsproben und schweineassoziierten Menschen, des ST398, zusätzlich zu den Virulenzgenen der Schweine vor.

Andere ST: Die blau markierten Virulenzgene kamen auch bei den Schweineisolaten des ST398 vor. Die grün markierten Virulenzfaktoren kamen nur bei den MRSA der Krankenhauspatienten nicht aber bei den MRSA des ST398 von Schweinen vor.

Diese höhere Anzahl an Virulenzfaktoren, zu denen auch sehr virulente wie das PVL-Gen und die Gene des IEC gehören, macht sie zu einem höheren Risiko für die Bevölkerung als die MRSA des ST398 der Schweine.

Kommt es, wie in der Abbildung 53 dargestellt wird, zu einer Einlieferung von Landwirten, Tierärzten oder anderen Personen mit Schweinekontakt in Krankenhäuser können die MRSA des ST398 auf andere Patienten übertragen werden, falls kein MRSA-Screening bei der Einlieferung erfolgte. Die MRSA des ST398 können im Krankenhaus über MGE neue Virulenzfaktoren von HA- und CA-MRSA, welche sich bereits in Krankenhäusern ausgebreitet haben, aufnehmen. Werden die schweineassoziierte Personen vor ihrer Entlassung nicht einem Entlassungsscreening unterzogen können die vermutlich virulenteren MRSA mit den neuen Virulenzgenen aus Krankenhäusern in die Schweinebetriebe eingetragen werden. Dies erklärt auch den Anstieg der Virulenz seit der Entdeckung des ST398 bei Schweinen im Jahre 2005 und den damit verbundenen vermutlichen Anstieg der Virulenz von MRSA des ST398. Um genaue Informationen über den derzeitigen Stand der Virulenz des ST398 von Schweinen zu erlangen, müssten Virulenzversuche durchgeführt werden von kürzlich entnommenen MRSA-Isolate des ST398 aus Schweinebetrieben und ein Vergleich mit den ersten Isolaten von 2005 stattfinden.

Die MRSA des ST398 mit neuen Virulenzgenen passen sich im Schweinebetrieb durch eine hohe Übertragungsrate, gute Wirtsadaption und weiterer Selektion der überlebensfähigsten MRSA nochmals besser an die Schweine an und können wieder auf Kontaktpersonen übertragen werden, sodass der Übertragungskreislauf von neuem beginnt.

Deshalb müsste in Krankenhäusern ein Aufnahme und Entlassungsscreening durchgeführt werden, um die Ausbreitung von MRSA des ST398 einzuschränken und der weiteren Aufnahme von Virulenzgenen entgegenzuwirken.

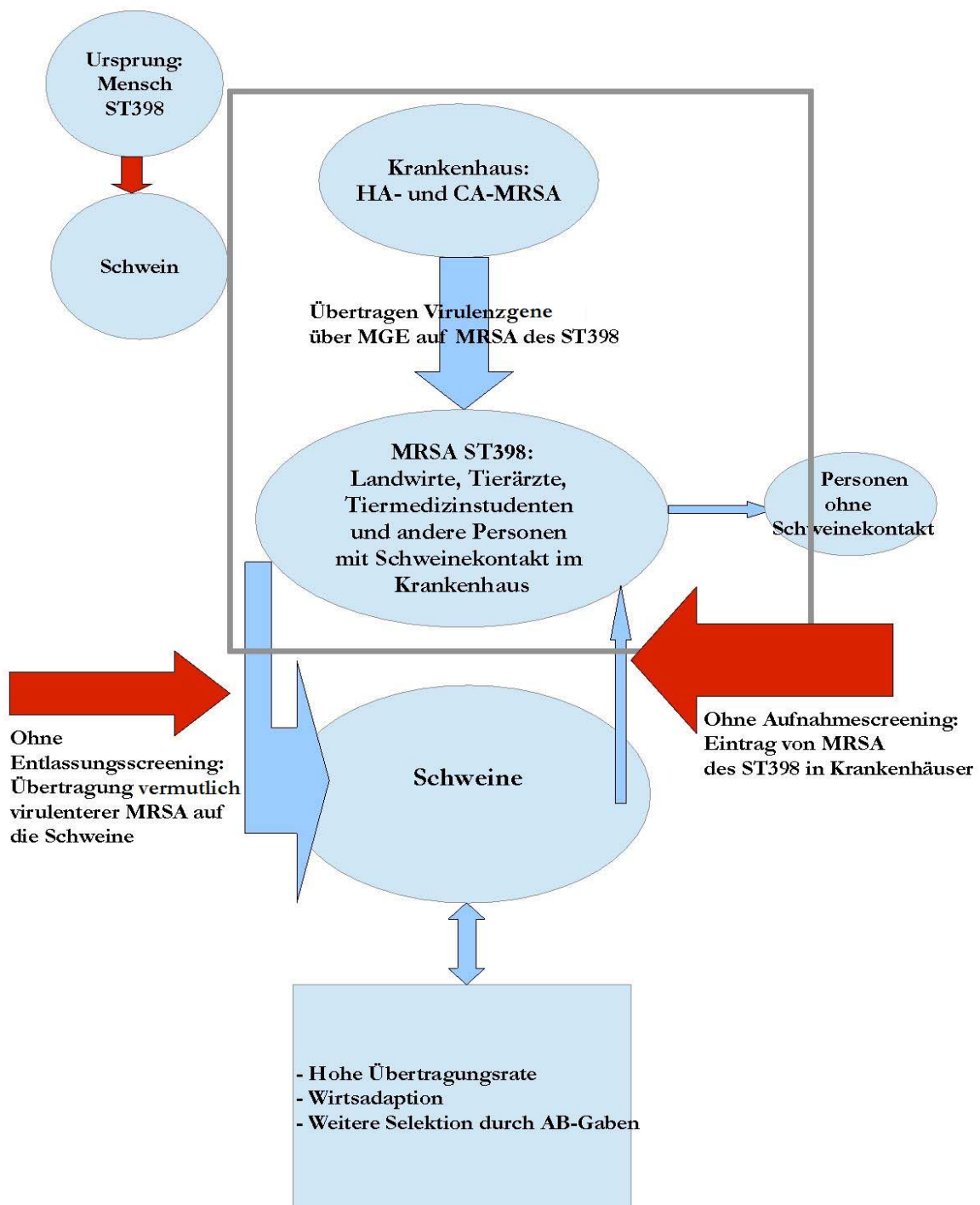


Abbildung 53: Übertragung neuer Virulenzgene von HA- und CA-MRSA im Krankenhaus auf MRSA des ST398 von schweineassoziierten Personen die keinem Aufnahmescreening unterzogen wurden.

Bei Entlassung ohne Entlassungsscreening werden vermutlich virulentere Isolate des ST398 mit mehr Virulenzfaktoren bzw. andere ST in die Schweinebetriebe eintragen, welche von dort wieder auf Kontaktpersonen übertragen werden können. So entsteht ein Kreislauf, welcher unterbrochen werden muss, um die Ausbreitung vermutlich immer virulenter werdender MRSA des ST398 zu stoppen.

5.8 MRSA des CC398 der Krankenhauspatienten

Unter den nachgewiesenen Virulenzgenen der fünf CC398 Isolate von Krankenhauspatienten war besonders auffällig, dass ein CC398-V Isolat eines kolonisierten Patienten sowie ein CC398 Isolat mit atypischer *SCCmec* eines invasiven Patienten die *sak*-, *scn*- und *chp*-Gene des IEC trugen. Diese Gene konnten in der vorliegenden Studie nur bei den Isolaten von Krankenhauspatienten nachgewiesen werden und das *scn*-Gen trat außerdem noch bei einem schweineassoziierten Menschen- und einem Umgebungsisolat auf (jeweils n=1/33, 3 %). Allerdings waren die Gene des IEC auch bei einem kolonisierten Patienten mit ST398-V und einem Invasiven mit einer atypischen *SCCmec* nachweisbar. Bei dem Invasiven konnte außerdem das beta-Hämolysin-Gen nachgewiesen werden, sodass ein horizontaler Gentransfer von HA- oder CA-MRSA in die ST398 Population zur Übertragung der beta-Hämolysin-Gene und Gene des IEC stattgefunden hat. Das Vorhandensein der Gene des IEC zeigt, dass der CC398 in der Lage ist weitere Gene zu erwerben, die im Krankenhaus bei HA- oder CA-MRSA vorkommen und diese vermutlich virulenten MRSA können dann von kolonisierten oder Personen mit MRSA in primär sterilen Materialien, in die Schweinebetriebe eingetragen werden, die Schweine befallen und auch auf den Menschen zurückübertragen werden.

Dies ist vor allem der Fall, da bereits in der vorliegenden Studie ein Umgebungsisolat positiv getestet wurde und die Schweine sich v.a. über infizierten Staub anstecken und es dann zu einer schnellen Ausbreitung unter den Tieren kommen kann. Außerdem entsteht eine Selektion der MRSA, die gegen die Antibiotika, welche im betroffenen Schweinebetrieb eingesetzt werden, resistent sind mit einer anschließenden Rückübertragung dieser resistenteren Bakterien auf den Menschen.

Alle deutschen MRSA-Isolate von Schweinen, die Kadlec et al. (2009) untersuchten waren weder Träger des *sak*-, *scn*- oder *chp*-Gens als Nachweis eines stattgefundenen horizontalen Gentransfers und auch die ST398-Isolate von Arguidin et al. (2011) waren *scn*-Gen-negativ. So

zeigt die vorliegende Studie das bereits virulentere CC398 existieren und folglich in die Schweinebetriebe eingetragen werden können, wie das *scn*-Gen-positive Umgebungsisolat und das Isolat eines schweineassoziierten Menschen verdeutlichen.

Der CC398 mit der atypischen *SCCmec* hat außerdem noch das *ssI9*-Gen erworben, was ihn von den bisher isolierten schweineassoziierten CC398 Isolaten unterscheidet, da das *ssI9*-Gen bisher nur bei Krankenhauspatienten aber keinem schweineassoziierten CC398 Isolat nachgewiesen werden konnte. Auch dies deutet auf die Entstehung vermutlich deutlich virulenterer CC398 Isolate hin, die sich weiter ausbreiten werden.

5.9 MSSA

In der vorliegenden Studie konnten auch sieben MSSA-Isolate durch den Microarray genotypisiert werden. Dabei war besonders auffällig, dass unter den CC398-MSSA-Isolaten das Toxik-Schock-Syndrom Toxin-Gen, die Enterotoxingene -a, -g und -l, das alpha- und gamma-Hämolysin-Gen, die Staphylococcen-like Enterotoxingene-1, -7, -9, -10, das Collagen-binding-adhesin-Gen, das Fibrinogen-binding Protein-Gen und das Gen der Staphylokinase als Virulenzfaktoren vorkamen. Das Fibrinogen-binding Protein-Gen konnte dagegen bei keinem schweineassoziierten MRSA-Isolat nachgewiesen werden, genauso wie das Toxik-Schock-Syndrom Toxin-Gen, das Enterotoxigen-l und die Staphylococcen-like Enterotoxingene *ssI7* und *ssI9*. Das Enterotoxigen-A kam bei keinem MRSA-Isolat eines schweineassoziierten Menschen in dieser Studie vor.

Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Virulenzfaktoren bereits auch ihren Weg in die Schweinebetriebe gefunden haben und durch MGE auch auf MRSA übertragen werden können, was folglich zu einer vermutlichen Virulenzsteigerung führt.

Jiménez et al. (2010) konnten bei einem untersuchten MSSA-Isolat des ST398 keine Enterotoxingeme und kein Toxik-Schock-Syndrom Toxin-1-Gen nachweisen im Gegensatz zu der vorliegenden Studie. Dagegen wurde von Uhlemann et al. (2012) bei MSSA des ST398 bereits das *sak*-Gen, welches der Umgehung des Immunsystems dient nachgewiesen, genauso wie die übertragende „beta-Convertig Phage“ und Lozano et al. (2011a) wiesen das *tsI1*-Gen bei MSSA des ST398 von gesunden Menschen nach. Somit wurde bereits die Aufnahmefähigkeit der MRSA des CC398 in Bezug auf diese Gene bestätigt.

Auch das ST211-MSSA-Isolat einer Sau war Träger des *tst1*-Gens, des alpha- und gamma-Hämolysins-Gens, des Enterotoxin-B-Gens, des *chp*-Gens, des *fib*- und *fnb*-Gens sowie des *ssl5*-Gens. Besonders wichtig ist, dass dieses ST211-MSSA-Isolat PVL-positiv war und somit das PVL-Gen schon den Weg in die deutschen Schweinebetriebe gefunden hat und auch auf MRSA des ST398 bzw. MSSA übertragen werden kann.

Die beiden MSSA des CC45 von zwei Landwirten enthielten die Enterotoxingene *g* und *j*, sowie das *sak*-, *chp*-, *fib*-Gen und das delta-Hämolysin-Gen, welche durch horizontalen Gentransfer übertragen werden. Besonders auffällig ist auch, dass das *fib*-Gen noch bei keinem schweineassoziierten MRSA-Isolat nachgewiesen werden konnte und somit von den Landwirten mit MSSA in ihre Schweinebetriebe eingetragen werden kann, genauso wie das *chp*-Gen und andere Gene zur vermutlichen Virulenzsteigerung.

5.10 MRSA aus Europa

In der vorliegenden Studie wurden noch MRSA-Isolate von Schweinen und Landwirten sowie Staubproben von Schweinebetrieben aus Spanien, Dänemark, den Niederlanden und der Schweiz untersucht und mit den deutschen Isolaten verglichen. Besonders auffällig war, dass neben dem ST398 (n=19/22), der der alleinige gefundene ST aus den deutschen Schweinebetrieben dieser Studie darstellte, noch der ST1-IV (4,5 %, n=1/22) und ST49-V (9,1 %, n=2/22) aus Nasentupfern von Schweinen aus der Schweiz isoliert werden konnte.

Der ST1, eines Schweineisolates aus der Schweiz, unterschied sich von den bisher untersuchten deutschen ST398 aus Schweinebetrieben, da er das *agr*-III-Gen, das Enterotoxingen-h, die *ssl2*-, -4-, -6-, -7-, -8-, -9-Gene sowie das *fib*-Gen enthielt, welche bei keinem deutschen Schwein vorkamen. Der ST49-V von Schweizer Schweinen, enthielt das *agr*-II-Gen sowie die Gene *ssl2*-, -4-, -6-, -7-, -8-, -9 welche auch nicht bei den deutschen Isolaten von Schweinen, Landwirten, Tierärzten sowie der Umgebung nachgewiesen werden konnten. Allerdings war er im Gegensatz zu den ST398 Isolaten *cna*-negativ. Dies zeigt, dass die Schweine auch mit anderen ST kolonisiert werden können, aber auch im Ausland meistens der ST398 vorkommt. Insgesamt gehörten 86,4 % der untersuchten ausländischen Isolate dem ST398 an und bisher trat nur selten der ST-1 oder ST49 bei Schweinen auf (Overesch et al. 2011, Franco et al. 2011, Babbisti et al. 2010).

Der ST-1-IV, ein CA-MRSA, wurde wahrscheinlich von einem Landwirt auf seine Schweine übertragen, genauso wie der ST-1, von dem bisher erstmals von Overesch et al. (2011) bei

Schweizer Schweinen berichtet wurde. Die ST1 und ST49 sind meistens in italienischen Krankenhäusern zu finden, in denen sich Landwirte anstecken können (Monaco et al. 2010). Auffällig ist auch, dass ein ST398 Isolat eines Schweizer Schweines Träger des *tsf1*-Gens war, welches nur bei einem deutschen Schwein mit MRSA des ST398 nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt wiederum, dass ST398 Isolate bei Kontakt zu Virulenzgenen diese über horizontalen Gentransfer aufnehmen können und somit vermutlich in der Lage sind ihre Virulenz zu steigern.

Die übermittelten und getesteten Resistenzen der ausländischen ST398 Isolate von Schweinen stimmen mit den Ergebnissen des Uniklinikums Heidelberg von den Schweinen dieser Studie überein und zeigen alle eine 100 % Resistenz gegen Penicilline und Tetracycline und eine Resistenz von 52-77 % gegen Clindamycin, Clarithromycin, Erythromycin und Trimethoprim und von 20,5 % gegen Gentamicin. Dies zeigt, dass die Schweine im Inland und Ausland v.a. gegen die häufig verwendeten Antibiotika in der Schweinezucht Penicilline, Tetracycline, Trimethoprim und Gentamicin Resistenzen aufweisen (Smith et al. 2009, Kadec et al. 2009, Fessler et al. 2010, Hausschild et al. 2012, Price et al. 2012). Der steigende Selektionsdruck, welcher durch die Antibiotikagaben und den gesteigerten Konkurrenzdruck der Bakterien im Betrieb ausgelöst wird, hat somit auch neben dem Erwerb der *SCC_{mec}-IV* und *-V* und der Resistenzgene, zum stetig steigenden Erwerb von Virulenzfaktoren geführt, um sich besser anzupassen und überleben zu können, wie auch in der vorliegenden Studie bewiesen werden konnte.

5.11 Auswertung der Fragebögen und Angaben der Landwirte zu Antibiotikagaben in ihrem Betrieb

Insgesamt wurden nur Fragebögen an Tierärzte und Studenten ausgeteilt sowie die Landwirte zu Antibiotikagaben in ihrem Betrieb befragt. Die Auswertung der Fragebögen zeigte, dass Tierärzte und Studenten mit einer vorangegangenen Antibiotikaeinnahme kein signifikant höheres Risiko haben nasal mit MRSA des CC398 besiedelt zu werden ($p=1,039$) und alle besiedelten den CC398-V aufwiesen nach der Arbeit im Schweinebetrieb.

Auch die Ergebnisse des MRSA-Status der Schweinebetriebe, im Zusammenhang mit einer vorangegangenen Antibiotikagabe an die Schweine, zeigen keinen signifikanten Unterschied. In dieser Studie fällt allerdings auf, dass Schweinebetriebe mit der Gabe von Penicillinen und anderen beta-Laktamen eine hohe MRSA-Prävalenz von 87,5 % ($n=7/8$) aufweisen und eine

MRSA-Prävalenz von 100 % bei der alleinigen Gabe von Amoxicillin vorlag. Fischer (2011) konnte keinen Zusammenhang zwischen Antibiotikagaben und der Prävalenz MRSA-positiver Schweine am Mastende feststellen genauso wie Frick (2010). Im Gegensatz dazu konnten Van Duijkeren et al. (2008) und Tenhagen et al. (2009) eine höhere MRSA-Prävalenz bei Mastschweinen, die Antibiotika erhalten hatten, ermitteln.

Jedoch war auch auffallend, dass Betriebe mit einer metaphylaktischen Gabe von Amoxicillin eine Prävalenz von 100 % MRSA-positiver Schweine aufwiesen und somit durch die Gabe von beta-Laktamen die Selektion der MRSA, des ST398, gefördert wird. Dies zeigten auch Van Duijkeren et al. (2007), sodass die Gaben von beta-Laktamen und Tetracyclinen mitverantwortlich sind für die Selektion der MRSA in den Schweinebetrieben. Deshalb sollte der Antibiotikaeinsatz bei Schweinen, genauso wie bei anderen Tieren und dem Menschen weiterhin streng kontrolliert werden, nach den Empfehlungen der Europäischen Arzneimittelagentur, der EFSA, der Weltgesundheitsorganisation und des Codex Alimentarius. Dadurch soll das Risiko der Entstehung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen begrenzt und die Verfügbarkeit von wirksamen Antibiotika gesichert werden. Ebenfalls muss der MRSA-Status von Personen mit Schweinekontakt erfasst werden, um andere Patienten im Krankenhaus, sowie bei der Rückkehr dieser Personen in den Betrieb, die Schweine vor MRSA, welche neue Virulenzgene erworben haben oder andere ST zu schützen.

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass 50,1 % der untersuchten Schweine und 85,2 % der Betriebe anhand von Schweinenasentupfern oder Umgebungsproben als MRSA-positiv einzustufen waren. Auch bei 56,3 % der untersuchten Umgebungsproben, 56,4 % der Landwirte, 22,2 % der Tierärzte und 68,8 % der Studenten konnten MRSA nachgewiesen werden. Die Prävalenzen liegen im oberen Drittel verglichen mit bisher stattgefundenen Studien, was für eine gute Probenentnahme und Anzucht spricht und zeigt, dass im Vergleich zu den vergangenen Jahren, seit ihrer Entdeckung 2005, die MRSA-Prävalenz in deutschen Schweinebetrieben immer mehr angestiegen ist. Dies geht darauf zurück, dass die Anpassung der MRSA des ST398 an die Schweine vermutlich immer besser und die MRSA immer virulenter werden, worauf die erhöhte Anzahl an Virulenzgene in dieser Studie hindeutet. Deshalb sollten Virulenzuntersuchungen angestrebt werden, um genauere Hinweise auf die mitmaßliche Virulenz von MRSA des ST398 zu erhalten.

Die MRSA-positive Umgebung der Schweine stellt außerdem eine ständige Infektionsquelle dar, was den Schweregrad, MRSA-freie Schweinebestände zu erhalten, aufzeigt und auch die hohe Anzahl an kolonisierten Studenten, Tierärzten und Landwirten kann auf die hohe MRSA-Prävalenz im Staub zurückgeführt werden. Die Umgebungsproben stellen eine gute und schnelle Screeningmöglichkeit der Betriebe dar, zur Erfassung des MRSA-Status eines Betriebes, da von den 23 MRSA-positiven Betrieben in 22 Fällen (95,7 %) auch MRSA in der Umgebung nachgewiesen werden konnten. In der vorliegenden Studie wurde des Weiteren gezeigt, dass die Sockentupfer sensitiver sind als die Entnahme von Staubproben. Auch die Spielketten und Tränken stellen, da sie immer in Kontakt mit den Schweinen stehen eine ständige Infektionsquelle für die MRSA-Übertragung zwischen den Schweinen dar.

In dieser Studie konnten alle MRSA-Isolate von Schweinen, Umgebungsproben sowie schweineassoziierten Menschen, aus Deutschland, dem CC398 zugeordnet werden mit einer deutlichen Dominanz des ST398-V und selten kam der ST398-IV sowie ein ST398 mit atypischer *SCC_{mec}* unter den Isolaten aus den Schweinebetrieben vor. Die hohe MRSA-Prävalenz des CC398, die im oberen Drittel im Vergleich zu bisher durchgeführten Studien einzuordnen ist, zeigt die gestiegene MRSA-Ausbreitung bei Landwirten, Tierärzten und Tiermedizinstudenten auf. Die MRSA des ST398 können auch von Landwirten oder anderen Personen mit Schweinekontakt auf Menschen ohne Schweinekontakt übertragen und in Krankenhäuser

eingetragen werden. Dies ist schon geschehen, da der ST398 auch im Uniklinikum Heidelberg nachgewiesen werden konnte. Über HA- und CA-MRSA können die ST398 Isolate neue Virulenzfaktoren über horizontalen Gentransfer erwerben. Sie werden dann wieder in Schweinebetriebe eingetragen, was die Ausbreitung von neuen Virulenzgenen unter den ST398 Isolaten von Schweinen erklärt. Das Vorkommen des ST1 und ST49 unter den MRSA-Isolaten von schweizerischen Schweinen zeigt, dass die Schweine auch mit anderen ST kolonisiert werden, falls Landwirte sich mit diesen im Krankenhaus anstecken und bei der Entlassung keinem MRSA-Screening unterzogen werden. Jedoch kommt auch im Ausland meistens der ST398 vor und auch 86,4 % der untersuchten Isolate aus dem Ausland in dieser Studie gehörten dem ST398 an. Unter den Isolaten von Krankenhauspatienten dominierte der ST5/ST225-MRSA-II/Rhein-Hessen mit 54,3 % (n=76/140). Der in den Schweinebetrieben isolierte ST398 konnte bei 3,6 % der Isolate von Krankenhauspatienten (n=5/140) nachgewiesen werden, sodass LA-MRSA des ST398 schon den Weg in Krankenhäuser gefunden haben. Deshalb sollten ein Aufnahmescreening und eine Isolierung bis zum Ergebnis des MRSA-Status aller Patienten mit Schweinekontakt durchgeführt werden, um weitere Patienten zu schützen jedoch auch ein Entlassungsscreening, um eine spätere Rückübertragung vermutlich virulenterer MRSA mit neuen Virulenzgenen oder anderen ST in die Schweinebetriebe zu unterbinden. Bei den MRSA-Isolaten des ST398 von Schweinen, Umgebungsproben und schweineassoziierten Menschen konnte das alpha-, beta- und gamma-Hämolysin-Gen sowie das *agr*-I-Gen nachgewiesen werden, die bereits in anderen Studien bei dem ST398 isoliert wurden. Das Beta-Hämolysin-Gen konnte bereits bei MRSA-Isolaten aus der Umgebung und von schweineassoziierten Menschen nachgewiesen werden, was zeigt, dass das Gen bereits auf MRSA des ST398 übertragen wurde und beginnt sich auszubreiten. Gerade bei diesen Isolaten konnte auch das *scn*-Gen zur Immunevasion nachgewiesen werden. Unter den Krankenhauspatienten mit dem ST398 kam bereits ein Isolat mit Beta-Hämolysin-Gen vor, sodass es folglich über MGE auf Schweineisolate übertragen werden kann. Auch das *lukD*-Gen wurde bei einem Isolat eines schweineassoziierten Menschen und einer Umgebungsprobe nachgewiesen, aber es fehlte bei den Schweineisolaten und das *lukE*-Gen fehlte völlig bei dem ST398, was ein Grund für das seltene Auftreten von klinischen Erscheinungen bei Schweinen zu sein scheint, da diese Virulenzfaktoren zu Hautinfektionen und Abszessen führen. Zu den nur selten auftretenden klinischen Erscheinungen trägt des Weiteren noch das Fehlen des *fib*-Gens bei den Isolaten des ST398 aus Schweinebeständen bei.

Das *cna*-Gen kam als einziges Gen viel häufiger unter den schweineassoziierten Isolaten vor und wurde nur bei einer geringen Anzahl an MRSA-Isolaten von Krankenhauspatienten nachgewiesen. Es spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung des ST398 unter Schweinen, da es eine hohe Bindungsaffinität zu porcinem Kollagen besitzt und somit die Kolonisation fördert. Unter den schweineassoziierten ST398-Isolaten konnten als weitere Virulenzfaktoren das *fnbA*- und *fnbB*-Gen, zur Oberflächenanheftung, sowie das *sasG*-Gen nachgewiesen werden. Somit hat eine mögliche Übertragung über horizontalen Gentransfer von HA- und CA-MRSA-Isolaten auf den ST398 bereits stattgefunden. Auch das *clfA*-, *clfB*- und Kapseltyp-5-Gen, die Enterotoxingene *sea* (0,76 %, n=1/132), *sea320* (2,3 %), *sed* (10,6 %), *seg* (2,3 %) und *sej* (1,5 %) und die Staphylococcal Superantigen-like Proteingene-1, -3, -5 und -10 konnten bei den LA-MRSA des ST398 von Schweineisolate gefunden werden. Das Auftreten der neuen Enterotoxingene *entA* und *entJ* und der Superantigen-like Protein-Gene zeigt, dass es dem ST398 gelungen ist weitere Virulenzgene zu erwerben und vermutlich seine Virulenz zu steigern. Das Vorkommen der Ssl-Proteine bei dem ST398 ist eine weitere Ursache für das Nichterkennen der MRSA durch das Immunsystem der Schweine und die weitere Ausbreitung in den Schweinebetrieben.

Insgesamt besteht die Gefahr, dass MRSA des ST398 von schweineassoziierten Personen in Krankenhäuser eingetragen werden, dort von HA- und CA-MRSA weitere Virulenzgene über horizontalen Gentransfer aufnehmen und von den Landwirten in die Schweinebetriebe eingetragen werden. Sie können sich von dort über Landwirte oder andere schweineassoziierte Personen wieder in der Bevölkerung weiter ausbreiten. Dieser Erwerb von Virulenzfaktoren ist bereits geschehen, da die LA-MRSA des ST398, im Vergleich zu früher analysierten LA-MRSA, seit der Entdeckung 2005, mehr Virulenzgene besitzen. Dies wird auch durch das Auftreten des *tst1*-Gens, bei einem MRSA-Isolat von einem Schwein, und des PVL-Gens bei einem MSSA Isolat von einer Sau verdeutlicht. Eine Übertragung des PVL-Gens auf porcine MSSA oder MRSA kann durch horizontalen Gentransfer erfolgen. Die Gefahr besteht besonders, da die LA-MRSA des ST398 die *SCCmec-V* und *-IV* besitzen. Diese können leicht das PVL-Gen, zur Virulenzsteigerung, aufnehmen und dann zu einer potentiellen Gefahr für die Bevölkerung werden, wie es bei den CA-MRSA bereits erfolgt ist. So sollte durch Aufnahme- und Entlassungsscreenings einer weiteren Ausbreitung viruleterer MRSA entgegengewirkt werden.

Die Auswertung der Fragebögen der Tierärzte und Studenten ergab, dass eine vorangegangene Antibiotikaeinnahme kein signifikant höheres Risiko darstellt mit MRSA des CC398 besiedelt zu

werden und auch vorangegangenen Antibiotikagaben an die Schweine zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das MRSA-Besiedelungsrisiko. Allerdings wiesen Betriebe mit Penicillin- und anderen beta-Laktamgaben eine hohe MRSA-Prävalenz auf, sodass der Antibiotikaeinsatz, in der Human- und Tiermedizin, weiterhin streng kontrolliert werden sollte, um der Entstehung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen entgegenzuwirken und die Verfügbarkeit von wirksamen Antibiotika zu sichern.

Zukünftige Studien müssen stattfinden, um den Eintrag von LA-MRSA in Krankenhäuser sowie die Virulenz des ST398 weiter zu erforschen und um zu klären wie das Screening für Risikogruppen, welche LA-MRSA haben könnten durchgeführt werden sollte, um einen horizontalen Gentransfer von Virulenzgenen zu unterbinden.

7. Zusammenfassung

LA-MRSA von Schweinen breiten sich seit ihrer Entdeckung im Jahre 2005 immer weiter unter den Schweinebetrieben und Personen mit Schweinekontakt aus. Von diesen Personengruppen können sie in Krankenhäuser eingetragen werden und stellen ein Risiko für die Bevölkerung dar. Genauso können aber auch mutmaßlich virulentere MRSA des ST398, welche in Krankenhäusern von HA- und CA-MRSA neue Virulenzgene über horizontalen Gentransfer erworben haben wieder von Landwirten, welche keinem Entlassungsscreening unterzogen wurden auf Schweine übertragen werden. So entsteht ein Kreislauf der Übertragung vermutlich immer virulenterer MRSA. Das Ziel dieser Studie war es MRSA von Schweinen, Landwirten, Tierärzten, Tiermedizinstudenten und Umgebungsproben zu isolieren und mit MRSA von Patienten aus dem Uniklinikum Heidelberg zu vergleichen, unter besonderer Berücksichtigung der Virulenzfaktoren. Außerdem sollte ein möglicher Eintrag von schweineassoziierten MRSA in das Uniklinikum Heidelberg nachgewiesen werden.

Als MRSA-Proben wurden Nasentupfer von Schweinen, Landwirten, Tierärzten und Studenten sowie Umgebungsproben entnommen und mit MRSA von Patienten des Uniklinikums Heidelberg verglichen. Die Tupfer wurden in CASO-Bouillon 24h bei 37 °C angereichert und auf COS-5 %-Agar sowie MRSA-ID Agar ausgestrichen und 24h bei 37 °C bebrütet. Die rosa gewachsenen MRSA-Kolonien von dem MRSA ID Agar wurden weiter durch MALDI-TOF als *S. aureus* und mittels VITEK2 als MRSA bestätigt. Bei den MRSA der Krankenhauspatienten erfolgte noch eine MRSA-Bestätigung mit einer *mecA-/femB*-PCR. Die Genotypisierung mit Analyse des ST und der Virulenzfaktoren wurde mit dem Microarray durchgeführt.

In der vorliegenden Studie konnten 85,2 % der Betriebe (n=23/27) anhand ihrer Schweine- bzw. der Umgebungsproben als MRSA-positiv eingestuft werden. Von den 23 MRSA-positiven Betrieben war in 21 Betrieben mindestens ein Schwein nasal besiedelt (77,7 %) und in 22 Betrieben (81,5 %) wurden MRSA in der Umgebung nachgewiesen. Von den beprobten Schweinen waren 50,1 % (n=172/343) nasal mit MRSA besiedelt. Insgesamt waren 56,4 % der Landwirte (n=22/39), 22,2 % der Tierärzte (n=2/9) und 68,8 % der Studenten (n=11/16) MRSA-positiv und in 15 Betrieben (n=15/27) waren sowohl die Landwirte als auch ihre Schweine MRSA-Träger. Insgesamt waren in der vorliegenden Studie 56,3 % der Umgebungsproben (n=72/128) MRSA-positiv und alle Isolate aus den Schweinebetrieben gehörten dem ST398 an, unter dem der ST398-V dominierte und selten der SCC398-IV oder ein

ST398 mit atypischer *SCCmec* vorkam. Auch bei 3,8 % (n=5/132) der Isolate von Krankenhauspatienten konnte der ST398 nachgewiesen werden und der ST5/ST225-MRSA-II/Rhein-Hessen dominierte mit 54,3 % (n=76/140). Bei 132 untersuchten MRSA-Isolaten von Schweinen kamen als Virulenzfaktoren bei 90,9 % (n=129/132) der Isolate das alpha-, bei 82,6 % das gamma- und bei 100 % das delta-Hämolysin-Gen vor. Außerdem konnte das *fnb-A*-Gen bei 93,9 %, das *fnb-B*-Gen bei 98,5 % sowie das *sasG*-Gen bei 15,2 % der Schweineisolate nachgewiesen werden. Bei den MRSA-Isolaten von Schweinen wurden außerdem noch als erstmals auftretende Gene, die Enterotoxingene *sea* sowie *sej* isoliert und auch die Staphylococcal Superantigen-like Proteine-1, -3, -5 und -10. Das Collagen-binding-adhesin-Gen stellte eine Ausnahme dar, da es bei allen Schweine- aber nur bei 25,7 % der Krankenhauspatientenisolate nachgewiesen werden konnte, während die anderen Virulenzgene häufiger unter den MRSA-Isolaten der Krankenhauspatienten nachzuweisen waren. Alle schweineassoziierten Isolate konnten der *agr*-I-Gruppe zugeordnet werden und die *SCCmec*-V dominierte, während die *SCCmec*-IV und eine atypische *SCCmec* selten vorkamen. Die MRSA-Isolate der Umgebungsproben und der schweineassoziierten Menschen wiesen, zusätzlich zu den Virulenzgenen der Schweine, noch das beta-Hämolysin-Gen und das *sak*-Gen des IEC auf (jeweils n=1/33). Das *sasG*-Gen konnte noch bei 3 % der Isolate von schweineassoziierten Menschen (n=1/33) und 6,1 % der Isolate von Umgebungsproben (n=2/33) nachgewiesen werden. Besonders auffällig war, dass das PVL-Gen welches bei 5,7 % (n=8/140) der analysierten MRSA von Patienten auftrat, bei keinem schweineassoziierten Isolat nachgewiesen werden konnte und auch bei keinem ST398 eines Krankenhauspatienten, allerdings kam es bei einem Isolat einer Sau mit MSSA des ST398 vor. Außerdem waren zwei ST398-Isolate von Krankenhauspatienten Träger der IEC-Gene *sak*, *scn*, *chp*, welche somit ihren Weg in die LA-MRSA-Population des ST398 gefunden haben. Unter den analysierten Schweizer-MRSA-Isolaten von Schweinen konnte auch der ST49 und ST1 gefunden werden, was zeigt, dass die Schweine auch von anderen ST befallen werden können, die andere Virulenzfaktoren in die Schweinebetriebe eintragen und so eine Rückübertragung mutmaßlich virulenterer MRSA auf den Menschen erfolgen kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten schweineassoziierten-MRSA bereits mehr Virulenzgene tragen als in früheren Studien beschrieben wurden und der ST398 somit in der Lage ist andere Virulenzgene über horizontalen Gentransfer von HA- oder CA-MRSA aufzunehmen. Deshalb sollten Personen mit Schweinekontakt vor- und nach einem Krankenhausbesuch auf MRSA getestet und gegebenenfalls saniert werden, da sie vor allem in Krankenhäusern MRSA

des ST398 auf andere Patienten übertragen können. Des Weiteren tragen ST398-positive Personen mit Schweinekontakt, welche nach einem Krankenhausbesuch nicht saniert wurden und Virulenzfaktoren von HA- oder CA-MRSA über horizontalen Gentransfer erworben haben, die wahrscheinlich virulenter gewordenen MRSA des ST398, in ihre Schweinepopulation ein. Diese MRSA des ST398 können nach weiterer Selektion im Schweinebetrieb wieder auf den Menschen zurückübertragen werden und wieder neue Virulenzgene erwerben. Da unter dem ST398, die *SCC_{mec}-V* überwiegt und auch die SCC-IV vorkommt sind diese LA-MRSA in der Lage das PVL-Gen über horizontalen Gentransfer, welches bereits in dieser Studie bei einem MSSA Isolat, einer Sau des ST398, nachgewiesen werden konnte zu erwerben. Das PVL-Gen hat somit bereits den Weg in die deutschen Schweinebestände gefunden. Das Vorkommen des *sak*-, *scn*- und *chp*-Gens, bei zwei ST398 Isolaten von Krankenhauspatienten zeigt, dass der ST398 in der Lage ist weitere Virulenzgene aufzunehmen, über MGE von HA- oder CA-MRSA, was ihn zu einem bedeutenden Risiko für die Bevölkerung sowie die Schweine macht. Folglich sollte vor und nach einem Krankenhausaufenthalt der MRSA-Status von Personen mit Schweinekontakt erfasst werden, um Kontaktpersonen sowie die Schweinen vor der Übertragung vermutlich immer virulenter werdender MRSA des ST398 zu schützen und die Ausbreitung einzudämmen.

8. Summary

Porcine LA-MRSA are spreading more and more at pig farms and among persons coming into contact with pigs since they were discovered in 2005. They can be brought into hospitals by these groups of persons and they pose a risk to the population. But in precisely the same way, probably more virulent MRSA of the ST398 strain which have acquired new virulence genes by horizontal gene transfer in hospitals from HA and CA-MRSA can be transferred again to pigs by farmers without discharge screening. This produces an infection loop for probably more and more virulent strains of MRSA. The aim of this study was to isolate MRSA strains from pigs, farmers, veterinarians, veterinary students and ambient samples and to compare them with MRSA of patients from the University Hospital of Heidelberg, with special consideration of the virulence factors. Furthermore, a possible transfer of pig-associated MRSA strains into the University Hospital of Heidelberg was to be proven.

As MRSA samples, nasal swabs were taken from pigs, farmers, veterinarians, veterinary students and farm ambient samples and they were compared with MRSA strains from patients of the University Hospital of Heidelberg. The swabs were enriched in tryptic soy agar (TSA) for 24 hours at 37°C and streaked on Columbia agar with 5% sheep's blood (COS) and MRSA ID agar and were incubated for 24 hours at 37°C. The pink grown MRSA colonies from the MRSA ID agar were also confirmed as *S. aureus* using MALDI-TOF technology and as MRSA using the VITEK 2 system. In addition, the MRSA strains from the hospital patients were confirmed as MRSA by *mecA*-/*femB*-PCR. Genotyping with an analysis of the ST and of the virulence factors was performed using the microarray.

85.2% of the farms (n=23/27) were classified as MRSA-positive farms on the basis of their pigs or the ambient samples in the present study. Twenty one of the 23 MRSA-positive farms had at least one pig with nasal MRSA colonisation (77.7%) and the presence of MRSA in the surrounding environment was verified at 22 farms (81.5%). 50.1% (n=172/343) of the tested pigs showed nasal colonisation with MRSA. Altogether, 56.4% of the farmers (n=22/39), 22.2% of the veterinarians (n=2/9) and 68.8% of the students (n=11/16) were MRSA-positive and both the pig farmers and their pigs were carriers of MRSA at 15 pig farms (n=15/27). All in all, 56.3% of the ambient samples (n=72/128) were MRSA-positive in the present study; all isolates from the pig farms belonged to the ST398 strain with a high dominance of the ST398-V strain and with rare occurrence of the SCC398-IV strain or an ST398 with an atypical *SCCmec*. Strains of

ST398 were also found in 3.8% (n=5/132) of the isolates from hospital patients, and the ST5/ST225-MRSA-II/Rhine Hesse strain dominated with 54.3% (n=76/140). In the MRSA isolates from pigs, alpha-haemolysin occurred as virulence factor in 90.9% of isolates (n=129/132), gamma-haemolysin in 82.6% and delta-haemolysin in 100%. Furthermore, the *fnb-A* gene was detected in 93.9% of the pigs, the *fnb-B* gene in 98.5% of pigs and the *sas-G* gene in 15.2% of the pig isolates. Furthermore in the MRSA isolates of pigs, we isolated for the first time the enterotoxin genes *sea* and *sej* and the staphylococcal superantigen-like proteins 1, 3, 5 and 10. Collagen-binding adhesin-gene was an exception because it was found in all pigs but in only 25.7% of the hospital patient isolates while the other virulence genes were detectable more frequently among the MRSA of the hospital patients. All pig-associated isolates were able to be assigned to *agr*-I-group and *SCCmec* type-V dominated while *SCCmec* type IV and an atypical *SCCmec* occurred rarely. The MRSA of the ambient samples and of the persons coming into contact with pigs also showed beta-haemolysin and the *sak* gene of the IEC system (each n=1/33), in addition to the virulence factors of the pigs. The *sasG* gene was still detected in 3% of the persons coming into contact with pigs (n=1/33) and 6.1% of the isolates from ambient samples (n=2/33). It was particularly noticeable that the PVL gene which occurred in 5.7% (n=8/140) of the analysed MSSA strains of patients was not detected in any pig-associated isolate and not in any ST398 of hospital patients, but it occurred on an isolate from a sow with MRSA of strain ST398. Furthermore, two ST398 isolates from hospital patients were carriers of the IEC genes *sak*, *scn* and *chp* which have thus found their way into the LA-MRSA population of ST398 strain. Amongst the analysed Swiss MRSA isolates from pigs, the ST49 and ST1 strains were also found, which indicates that the pigs may also be infected with other ST strains which can bring other virulence factors into the pig farms, thus possibly leading to back-transfer of probably more virulent MRSA to humans.

The results indicate that the analysed pig-associated MRSA already carry more virulence genes than described in earlier studies and that the ST398 strain is thus capable of assimilating other virulence factors via horizontal gene transfer if it contacts HA- or CA-MRSA. This is why persons coming into contact with pigs should have an MRSA screening examination before and after a hospital visit and should be cleared of it if necessary since they can transfer MRSA of strain ST398 to other patients, above all in hospitals. Moreover, ST398-positive persons having contact with pigs who were not cleared of it after a hospital visit and who had contact with HA- or CA-MRSA bring the MRSA of the ST398 strain which have become probably more virulent into their pig population. These MRSA of the ST398 strain can be transferred back to humans

after further selection at the pig farm and they can acquire new virulence genes again. Since *SCCmec* type V dominates and SCC type IV also occurs amongst the ST398 strain, these LA-MRSA are capable of assimilating the PVL gene via horizontal gene transfer. The PVL gene was already proven to be present in this study in an MSSA isolate, a sow with strain ST398, which indicates that it has already found its way into German pig farms. The appearance of the *sak*, *scn* and *chp* genes on two ST398 isolates from hospital patients indicates that the ST398 strain is capable of assimilating further virulence genes via MGEs from HA- or CA-MRSA, which makes it a significant risk for the population and the pigs. Consequently, the MRSA status of persons in contact with pigs should be determined before and after a stay in hospital to protect persons they come into contact with against transmission of more and more virulent MRSA of strain ST398 and to curb spread.

Literaturverzeichnis

AIRES DE SOUSA M., SANTOS SANCHES I., FERRO M. L., DE LENCASTRE H. (2000):

Epidemiological study of staphylococcal colonization and cross-infection in two West African hospitals.

Microb. Drug Resist. 6:133–141

ALT K. , FETSCH A., SCHROETER A., GUERRA B., HAMMERL J., ET AL. (2011):

Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany.

Zoonose Publ. Health 58:343–349

ARGUDÍN M.A., FETSCH A., TENHAGEN B.-A., HAMMERL J.A., HERTWIG S., KOWALL J., RODICIO M. R., KÄSBOHRER A., HELMUTH R., ET AL. (2010):

High heterogeneity within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and *spa*- and *SCCmec*-types.

Appl. Environ. Microbiol. 76(3):652

ARGUDÍN M. A., RODICIO M. R., GUERRA B. (2009):

The emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clone can easily be typed using Cfr9I SmaI neoschizomer.

Lett. Appl. Microbiol. 50:127–130

ARIAS A., MORCILLO A., CASTRO B., RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ C., GONZÁLEZ J.C., SIERRA A., MONTESINOS M. I., ABREU R. (2010):

Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine and swine workers in Tenerife, Spain.

Foodborne Pathog. Dis. 9(3):207–210

ARMAND-LEFEVRE L., RUIMY R., ANDREMON A. (2005):

Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls and pigs.

Emerg. Infect. Dis. 11:711–714

ARVIDSON S., TEGMARK K. (2001):

Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*.

Int. J. Med. Microbiol. 291:159–170

AUBRY-DAMON H., GRENET K., NIDAYE-SALL P., ET AL. (2004):

Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers.

Emerg. Infect. Dis. 10:873–879

ATSHAN S., NORSHAMSUDIN M., SEKAWI Z., ET AL. (2012):

Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*.

J. Biomed. Biotechnol. 18:106–112

BABA T., TAKEUCHI F., KURODA M., YUZAWA H., AOKI K., OGUCHI A., NAGAI Y., IWAMA N., ASANO K., NAIMI T., KURODA H., CUI L., YAMAMOTO K., HIRAMATSU K. (2002):

Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.

Lancet 359:1819–1827

BALWIT J. M., VAN LANGEVELDE P., VANN J. M., PROCTOR R. A. (1994):

Gentamicin-resistant aureus and menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells.

J. Infect. Dis. 170:1033–1037

BANNERMAN T. L. (2003):

Staphylococcus, micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically.

In: Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C.

Manual Clinical Microbiology, Ausgabe: 8:384–394

BAQUERO F. (2011):

The 2010 Garrod lecture: the dimensions of evolution in antibiotic resistance.

J. Antimicrob. Chemother. 66:1659–1672

BAQUERO F. (2012):

On the shifting balance: the case of *Staphylococcus aureus* CC398.

mBio. 3(2):e00078–12

BARBERIS-MAINO, L., BERGER-BACHI B., WEBER H., BECK W.D., KAYSER F.H. (1987):

IS431, a staphylococcal insertion sequence-like element related to IS26 from proteus mirabilis.

Gene 59:107–113

BARDIAU M., YAMAZAKI K., DUPREZ J. N., TAMINIAU B., MAINIL J. G., OTE I. (2013):

Genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis.

Lett. Appl. Microbiol. 57(3):181–186

BARSKI P., PIECHOWICZ L., GALINSKI J., KUR J. (1996):

Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR.

Mol. Cell. Probes 10:471–475

BATTISTI A., FRANCO A., MERIALDI G., HASMAN H., IURESCIA M., LORENZETTI R., ET AL. (2010):

Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings.

Vet. Microbiol. 142:361–366

BÄURLE H., TAMÁSY C. (2012):

Regionale Konzentrationen der Nutztierhaltung in Deutschland

Stat. Bundesamt Mitt. Heft 79

BD BBL™ (2006):

CHROMagar™ MRSA, Becton Dickinson GmbH, Gebrauchsanweisung gebrauchsfertige Plattenmedien.

<http://prod.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/DE-PA-257308.pdf>

BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., MEIER C., ET AL. (2004):

Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence datafor 16S-rDNA based identification of *Staphylococcus* species.

J. Clin. Microbiol. 42(11):4988–4995

BECKER K., PETERS G. (2009):

Resistenzen bei Staphylokokken.

In: Neumeister B., Geiss H. K., Braun R. W., Kimming P.

Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie,

Thieme Verlag, 2. Auflage:276–280

BECKER K., VON EIFF C. (2006):

Staphylococcus aureus “Small Colony Variants”- ein unbekanntes Gesicht eines bekannten Erregers.

Mikrobiologie 16(1):17–26

BECKER K., VON EIFF C., KELLER B., BRÜCK M., ET AL. (2005):

Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: Use of a PCR-DNA enzyme immunoassay.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 51(4):234–244

BEKKAOUI F., MCNEVIN J. P., LEUNG C. H., PETERSON G. J., PATEL A., BHATT R. S., BRYAN R. N. (1999):

Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococci* using a colorimetric cycling probe technology.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34:83–90

BELMONTE G., CESCATTI L., FERRARI B., NICOLUSSI T., ROPELE M., MENESTRINA G. (1987):

Pore-formation by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in lipid bilayers: temperature and toxin concentration dependence.

Eur. J. Biophys. 14:349–358

BENS C. C., VOSS A., KLAASSEN U. (2006):

Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farmers leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis.

J. Clin. Microbiol. 44:1875–1876

BERGSTRÖM K., ASPAN A., LANDÉN A., JOHNSTON C., GRÖNLUND-ANDERSSON U. (2012):

The first nosocomial outbreak of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in horses in Sweden.

Acta Vet. Scand. 54:11

BERNHEIMER A. W., AVIGAD L. S., KIM K. S. (1974):

Staphylococcal sphingomyelinase.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 236:292–306

BESTEBROER J., ET AL. (2007):

Staphylococcal superantigen-like-5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin mediated neutrophil rolling.

Blood 109:2936–2943

BfR (2009):

Untersuchung zur Bestimmung der Prävalenz und Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Mastschweinebeständen ausgewählter (Bundes)länder

BfR Abschlussbericht Juli 2009:1–12

BHAT M., DUMORTIER C., TAYLOR B. S., MILLER M., VASQUEZ G., YUNEN J., BRUDNEY K., SANCHEZ E. J., RODRIGUEZ-TAVERAS C., ROJAS R., LEON P., LOWY F.D. (2009):

Staphylococcus aureus ST398, New York City and Dominican Republic.

Emerg. Infect. Dis. 15:285–287

BIGNARDI G. E., WOODFORD N., CHAPMAN A., JOHNSON A. P., SPELLER D. C. (1996):

Detection of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance.

J. Antimicrob. Chemother. 37:53–63

BIRBECK T. H., FREER J. H. (1988):

Purification and assay of staphylococcal-lysin.

Methods Enzymol. 165:16–22

BLOMSTER-HAUTAMAA D. A., KREISWIRTH B. N., NOVICK R. P., SCHLIEVERT P. M. (1986):

The resolution of highly purified toxic-shock syndrome toxin-1 (TSST-1) into two distinct proteins by isoelectric focusing.

Biochemistry 25:54–59

BODE K., BURCKHARDT I., HEEG K. (2008):

Identifizierung von Mikroorganismen mittels MALDI, Massen – Spektrometrie

Standardarbeitsanweisung (VA/ID/027-6, Universitätsklinikum Heidelberg):1–38

BOHACH G., FAST A. D. J., NELSON R. D., SCHLIEVERT P. M. (1990):

Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses.

Crit. Rev. Microbiol. 17:251–272

BOHACH G. A., DINGES M. M., MITCHELL D. T., OHLENDORF D. H., SCHLIEVERT P. M. (1997):

The staphylococci in human disease; Exotoxins.

In: Crossley K. B., Archer G. L., 83–111

BOHACH G. A., JABLONSKI L., ROGGIANI M., SADLER I., SCHLIEVERT P. M., MITCHELL D., OHLENDORF D. (1998):

Biological activity of pyrogenic toxins delivered at the mucosal surface.

In: Arbuthnott J., Furman B.

European Conference on Toxic Shock Syndrome. International Congress and Symposium

Royal Society of Medicine, Ausgabe 229:170–172

BOOST M. V., O'DONOGHUE M. M., SIU K. H. (2007):

Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners

Clin. Microbiol. Infect. 13:731–733

BOSCH T., DE NEELING A. J., SCHOULS L. M., VAN DER ZWALUW K. W., KLUYTMANS J. A. J. W., GRUNDMANN H., HUIJSDENS X. W. (2010):

PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398.

BMC Microb. 10:40

BOYLE-VAVRA S., DAUM R. S. (2007):

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin.

Lab. Invest. 87:3–9

BIBERSTEIN E.L., HIRSH D. C. (1999):

Staphylococci

D.C Hirsh, Y.C. Zee:

Vet. Microb. Blackwell Science p. 115-119

BRAKSTAD O. G., AASBAKK K., MAELAND J. A. (1992):

Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene.

J. Clin. Microbiol. 30:1654–1660

BROCKERS B. (2011):

Untersuchung zum Vorkommen und zur Kolonisationsdynamik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) bei Schweinen in Mastbeständen in Nordwestdeutschland und Ostdeutschland.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

BROENS E. M., GRAAT E. A. M., VAN DER WOLF P. J., VAN DE GIESSEN A. W., DE JONG M. C. M. (2011):

Prevalence and risk factor analysis of livestock-associated MRSA-positive pig herds in the Netherlands.

Prevent. Vet. Medicine 102:41-49

BUNDESMINISTERIUM FÜR RISIKOBEWERTUNG (BfR) (2009):

Menschen können sich über den Kontakt mit Nutztieren mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) infizieren.

BfR Stellungnahme 14:1–30

BURGMAN H. (2006):

Chinolone 2007 – Ein Update

Antibiotika Monitor: Sonderheft 6

CAMOEZ M., SIERRA J., PUJOL M., HORNERO A., MARTÍN R., DOMÍNGUEZ M. (2012):

Epidemiology of MRSA in various European countries: Prevalence and molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 over 12 years in a Spanish hospital.

ESCMID 2012, poster

CANONICO P. G., VAN ZWEITEN M. J. (1971):

Swelling of mitochondria from rabbit liver induced by staphylococcal enterotoxin B.

J. Infect. Dis. 124:372–378

CARLETON H. A., DIEP B. A., CHARLEBOIS E. D., ET AL. (2004):

Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA.

J. Infect. Dis. 190:1730–1738

CARROCCIO A., CAVATAIO F., MONTALTOG., ET AL. (2000):

Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and diet a treatment.

Clin. Exp. Allergy 30:1597–1603

CARTER G. R., WISE D. J. (2004):

Essentials of veterinary bacteriology and mycology.

Iowa State Press 6:193–196

CAVACO L. M., HASMAN H., AARESTRUP F. M. (2011):

Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance.

Vet. Microbiol. 150(3–4):344–348

CAVASSINI M., WENGER A., JATON K., BLANC D.S., BILLE J. (1999):

Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 37:1591–1594.

CHABERNY I. F. (2005):

Übersicht über die aktuellen MRSA-Screening-Methoden in deutschen Universitätskliniken

Der Mikrobiologe 5:173-174

CHAMBERS H. F. (1997):

Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular, biochemical and clinical.

Clin. Microbiol. Review. 10(4):781–791

CHESNEY P. J. (1989):

Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview.

Rev. Infect. Dis. 11:1–7

CHEUNG A. L., EBERHARDT K. J., CHUNG E., YEAMAN M. R., SULLAM P. M., RAMOS M., BAYER A. S. (1994):

Diminished virulence of a *sar*-/*agr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis.

J. Clin. Invest. 94:1815–1822

CHEUNG A. L., KOOMEY J. M., BUTLER C. A., PROJAN S. J., FISCHETTI V. A. (1992):

Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6462–6466

CLARKE S. R., FOSTER S. J. (2006):

Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*.

Adv. Microb. Physiol. 51:187–224

CLINE M., BIRBECK T. H., ARBUTHNOTT J. P. (1992):

Characterization of staphylococcal gamma-lysin.

J. Gen. Microbiol. 138:923–930

COELLO R., GLYNN J. R., GASPAR C. (1997):

Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA.

J. Hosp. Infect. 37:39–46

COHN L. A., MIDDLETON J. R. (2010):

A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci.

J. Vet. Emerg. Crit. Care 20:31–45

COLIN D. A., MAZURIER I., SIRE S., FINCK-BARBANCON V. (1994):

Staphylococcus aureus of the two components of leukocidin from with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation

Infect. Immun. 62:3184–3188

COMPERNOLLE V., VERSCHRAEGEN G., CLAEYS G. (2007):

Combined use of pastorex Staph-Plus and either of two new chromogenic agars, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 45(1):154

COOMBS G. W. (2006):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia.

Emerg. Infect. Dis. 12:241–247

CORINA C., BENS P. M., VOSS A., KLAASSEN C. H. W. (2006):

Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis.

J. Clin. Microbiol. 5(44):1875–1876

CORRIGAN R. M., RIGBY D., HANDLEY P., FOSTER T. J. (2007):

The role of *Staphylococcus aureus* surface protein *sasG* in adherence and biofilm formation.

Microbiology 153:2435–2446

CORVAGLIA A. R., FRANCOIS P., HERNANDEZ D., ET AL. (2010):

A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(26):11954–11958

COUPPIE P., CRIBIER B., PREVOST G., GROSSHANS E., PIEMONT Y. (1994):

Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study.

Arch. Dermatol. 130:1208–1209

COUTO N., TILLEY P., SIMÕES J., SALES LUIS J. P., POMBA C. (2012):

First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST5 and ST398 from Purebred Lusitano Horses.

J. Equine Vet. Sci. 32(5):300–304

CRIBIER B., PRÉVOST G., COUPPIÉ P., FINCK-BARBANCON V, GROSSHANS E., PIÉMONT Y. (1992):

Staphylococcus aureus leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study.

Dermatology 185:175–85

**CUNY C., FRIEDRICH A., KOZYTSKA S., LAYER F., NUBEL U., STROMMENDER B.,
WALTHER B., KNUT L., WIELER O., WITTE W. (2010):**

Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species

Int. J. Med. Microb. 300:109–111

**CUNY C., KUEMMERLE J., STANEK C., WILLEY B., STROMMENDER B., WITTE W.
(2006):**

Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans.

Euro. Surveill. 11:595–605

CUNY C., NATHAUS R., LAYER F., STROMMENDER B., ALTMANN D., ET AL. (2009):

Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs.

PLoS ONE 4(8):e6800

DALPKE A., HOFKO M. (2008):

„Nukleinsäureisolation (DNA)“.

Standardarbeitsanweisung (PC/ME/002-3) 1:1–12

DASCHNER F., DCHLUMPELICK V. (2002):

MRSA als Herausforderung an die klinische Organisation

Chirurg 73:924–929

DAUM R. S., ITO T., HIRAMATSU K., HUSSAIN F., MONGKOLRATTANOTHAI K., JAMKLANG M., BOYLE-VAVRA S. (2002):

A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds.

J. Infect. Dis. 186:1344–1347

DAUWALDER O., LINA G., DURAND G., ET AL. (2008):

Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007.

J. Clin. Microbiol. 46:3454–3458

DAVIS J. P., CHESNEY P. J., WAN P. J., LAVENTURE M., ET AL. (1980):

Toxic-shock syndrome: epidemiologic features, recurrence, risk factors, and prevention.

N. Engl. J. Med. 303:1429–1435

DAVIES S. (1997):

Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the evaluation of rapid agglutination methods.

Br. J. Biomed. Sci. 54:13–15

DEEPA P., WINES B. D., LANGLEY R. J., ET AL. (2010):

Specificity of staphylococcal superantigen-like protein 10 toward the human IgG1 Fc-domain.

J. Immunol. 2010; 184:6283-6292

DELEO F. R., DIEP B. A., OTTO M. (2009):

Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections.

Infect. Dis. Clin. North Am. 23:17–34

DELGIUDICE P., BLANC V., DURUPT F., BES M., MARTINEZ J. P., COUNILLON E., LINA G., VANDENESCH F., ETIENNE J. (2006):

Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquire skin infections.

Br. J. Dermatol. 154:118–124

DEL LEO F. R., OTTO M., KREISWIRTH B. N., CHAMBERS H. F. (2010):

Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Lancet. 375(9725):1557–1568

DELMAS J., CHACORNAC J. P., ROBIN F., GIAMMARINARO P., TALON R., BONNET R. (2008):

Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species.

J. Clin. Microbiol. 46:311–313

DE NEELING A. J., VAN DEN BROEK M. J., SPALBURG E. C., VAN SANTEN-VERHEUVEL M. G., DAM-DEISZ W. D., BOSHUIZEN H. C., VAN DE GIESSEN A. W., VAN DUIJKEREN E., HUIJSDENS X. W. (2007):

High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs.

Vet. Microbiol. 122:366–372

DENIS O., SUETENS C., HALLIN M., CATRY B., RAMBOER I., DISPAS M., WILLEMS G., GORDTS B., BUTAYE P., STRUELENS M.J. (2009):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST 398 in swine farm personnel, Belgium.

Emerg. Infect. Dis. 7:1098–1101

DERESINSKI S. (2005):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey.

Clin. Infect. Dis. 40(4):562–573

DERESIEWICZ R. L. (1996):

Staphylococcal toxic shock syndrome.

In D. Y. M. Leung, B. T. Huber, and P. M. Schlievert

Superantigens: molecular biology, immunology and relevance to human disease 1:435–479

DEURENBERG R. H., STOBBERINGH E. E. (2008):

The evolution of *Staphylococcus aureus*.

Infect. Genet. Evol. 8:747–763

DEURENBERG R. H., VINK C., KALENIC S., FRIEDRICH A. W., RUGGEMAN C. A., STOBBERINGH E. E. (2006):

The molecular evolution of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Clin. Microbiol. Infect. 13:222-235

DEVRIESE L. A., HOMMEZ J. (1975):

Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds.

Res. Vet. Sci. 19:23-32

DEVRIESE L. A., VANDAMME L. R., FAMEREE L. (1972):

Methicillin (cloxacillin)-resistant isolated from bovine mastitis *S. aureus*.

Zentralbl. Veterinärmed. 19(7):598–605

DHOPLE V. M., NAGARAJ R. (1993):

Delta-toxin, unlike melittin, has only hemolytic activity and no antimicrobial activity: rationalization of this specific biological activity.

Biosci. Rep. 13:245–250

DIEDEREN B., VAN DUIJN I., VAN BELKUM A., WILLEMSE P., VAN KEULEN P, KLUYTMANS J. (2005):

Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 43(4) :1925-1927

DIEP B. A., CHAN L., TATTEVIN P., ET AL. (2010):

Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:5587–5592

DINGES M. M., ORWIN P. M., SCHLIEVERT P. M. (2010):

Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.

Clin. Microbiol. 13(1):16

DOMANN E., HOSSAIN H., FUESSLE R., CHAKRABORTY T. (2000):

Schneller und zuverlässiger Nachweis multiresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) durch Multiplex-PCR.

Dtsch. Med. Wochenschrift 125:613–618

DRUCKER D. B. (1994):

Fast atom bombardment mass spectrometry of phospholipids for bacterial chemotaxonomy.

In: Fenselau C.

Mass spectrometry for the characterization of microorganisms.

ACS symposium series, Washington DC, American Chem. Soc. 541:18–35

DUBOIS D., LEYSSENE D., CHACORNAC J. P., KOSTRZEWA M., SCHMIT P. O., TALON R., BONNET R., DELMAS J. (2010):

Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

J. Clin. Microbiol. 48(3):941

DUFOUR P., JARRAUD S., VANDENESCH F., GREENLAND T., NOVICK R. P., BES M., ETIENNE J., LINA G. (2002):

High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species.

J. Bacteriol. 184:1180–1186

EKKELKAMP M. B., SEKKAT M., CARPAIJ N. (2006):

Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs.

Ned. Tijdschr. Geneesk. 150:2442–2447

ELSAIED M. D., CHOW B. L., HAMILTON N. L., GREGSON D. B., PITOUT J. D. D., CHURCH D. L. (2003):

Development and validation of a molecular probe-based real time polymerase chain reaction assay for rapid detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*.

Arch. Pathol. Lab. Med. 127:845–849

ENDER M., MCCALLUM N., ADHIKARI R., ET AL. (2004):

Fitness cost of *SCCmec* and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 48:2295–2297

ENRIGHT M. C., DAY N. P. J., DAVIES C. E., PEACOCK S. J., SPRATT B. G. (2000):

Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 38(3):1008-1015

ENRIGHT M., ROBINSON D., RANDLE G., FEIL E. J., GRUNDMANN H., SPRATT B. G. (2002):

The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7687–7692.

FANG H., HEDIN G. (2003):

Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay.

J. Clin. Microbiol. 41: 2894 –2899

FANOY E., HELMHOUT L. C., VAN DERVAART L., WEIJDEMA K., VAN SANTEN VERHEUVEL M. G., THIJSSEN S. F., DE NEELING A. J., VAN WAMEL W. J., MANASKOVA S. H., KINGMA-THIJSEN J. L. (2009):

An outbreak of non-typeable MRSA within a residential care facility.

Euro. Surveill. 14(1).pi:19080

FEIL E. J., MAIDEN M. C. J., ACHTMAN M., SPRATT B. G. (1999):

The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*.

Mol. Biol. Evol. 16:1496–1502

FENSELAU C. (1994):

Mass spectrometry for the characterization of microorganisms.

ACS symposium series, Washington DC, American Chemical Society 541:18–35

FESSLER A., SCOTT C., KADLEC K., EHRLICH R., MONECKE S., SCHWAR S. (2010):

Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis.

J. Antimicrobiol. Chemother. 65:619–625

FETSCH A., TENHAGEN B.-A., GUERRA B., HERTWIG S., HAMMERL J.-A., KÄSBOHRER G., BRÄUNIG J., APPEL B. (2009):

Risikoabschätzung von LA-MRSA in der Lebensmittelkette – Molekulare Diagnostik als Werkzeug zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 116:291–296

FINCK-BARBANCON V., DUPORTAIL G., MEUNIER O., COLIN D.A. (1993):

Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes.

Biochim. Biophys. Acta 1182:275–28

FINCK-BARBANCON V., PRÉVOST G., PIÉMONT Y. (1991):

Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains.

Res. Microbiol. 142:75–85

FISCHER, S. K. (2011):

Untersuchungen zur Intraherdenprävalenz von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Schweinebeständen in Süddeutschland.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

FITZGERALD J. R., ET AL. (2012):

Human Origin for Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

mBio 3(2):e00082-12

FITZGERALD J. R., REID S. D., RUOTSALAINEN E., TRIPP T. J., LIU M., COLE R., KUUSELA P., SCHLIEVERT P. M., JARVINEN A., MUSSER J. M. (2003):

Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins.

Infect. Immun. 71:2827–2838

FITZNER J. (2003):

Enterococcus faecium: Prävalenz von Vancomycin-Resistenzgenen und Persistenz bei gesunden Probanden.

Berlin, Freie Universität, Institut für Umwelt und Hygienemedizin, Diss.

FLEISCHER B., SCHREZENMEIER J. (1988):

T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins.

J. Exp. Med. 167:1697–1707

FORSGREN A., SJÖQUIST J. (1966):

"PROTEIN A" from *S. aureus*: Pseudo-immune reaction with human γ -globulin.

J.Immunol. 97(6):822–827

FOSTER T. J. (2002):

Staphylococcus aureus.

In: Sussman M.

Molecular Medical Microbiology.

Academic Press:839–888

FOSTER T. J., ET AL. (2005):

Immune evasion by staphylococci.

Nat. Rev. Microbiol. 3:948–995

FOSTER T. J., HÖÖK M. (1998):

Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*.

Trends Microbiol. 6:484

FOTI M., FISICHELLA V., GIACOPELLO C. (2012):

Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the microbial flora from the conjunctiva of healthy donkeys from Sicily (Italy).

Vet. Ophth. 16(2):89–92

FOURNIER J. M., BOUVET A., MATHIEU D., NATO F., BOUTONNIER A., GERBAL R., BRUNENGO P., SAULNIER C., SAGOT N., SLIZEWICZ B. (1993):

Latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J.Clin. Microbiol. 31:1342–1344

FRANCO A., HASMAN H., IURESCIA M., ET AL. (2011):

Molecular characterization of *spa*-type t127, sequence type-1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs.

J. Antimicrob. Chemother. 66:1231–1235

FREER J. H., ARBUTHNOTT J. P. (1983):

Toxins of *Staphylococcus aureus*.

Pharmacol. Ther. 19:55–106

FREER J. H., BIRBECK T. H. (1982):

Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*.

J. Theor. Biol. 94:535–540

FREITAS-BAQUEIRO L. F., SANTOS C. L., FERREIRA F. (2011):

Epidemiologic profile of *Staphylococcus aureus*-methicillin resistant (MRSA) bacterium in hospital-acquired-infection in neonatal-intensive-care-unit (ICU) from -2000 to 2010 analysis in general hospital.

BMC Proceedings 5(6):173

FRÉNAY H. M., BUNSCHOTEN A. E., SCHOULS L. M., VAN LEEUWEN W. J., VANDENBROUCKE-GRAULS C. M., VERHOEF J., MOOI F. R. (1996):

Molecular typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:60-64

FRICK J. E. (2010):

Prävalenz Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bayerischen Schweinebeständen.

München, LMU, Fachber. Veterinärmed., Diss.

FRIEDRICH A. (2009):

Vernetzter Kampf gegen MRSA.

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=29463>

FUJIKAWA H., IGARASHI H., USAMI H., TANAKA S., TAMURA H. (1986):

Clearance of endotoxin from blood of rabbits injected with staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1.

Infect. Immun. 52:134–137

GARCIA-ALVAREZ L., ET AL. (2011):

Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study.

Lancet Infect. Dis. 11:595–603

GATERMANN S., MIKSITS K. (2009):

Staphylokokken.

In: Hahn H. S., Kaufmann H. E., Schulz T. F., Suerbaum S.

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 6:191–202

GEHA D. J., UHL J. R., GUSTAFERRO C. A., PERSING D. H. (1994):

Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory.

J. Clin. Microbiol. 32:1768–1772

GEISEL R., SCHMITZ F. J. (2003):

Resistenzphänotypen und –genotypen bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolaten: Fusidinsäure und Cotrimoxazol.

Chemother. J. 6:68–173

GEISS H. K., MACK D., SEIFERT H. (2004):

Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von Ergebnissen der Antibiotika-Empfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern.

Chemother. J. 13:1–16

GEISS M., FREY M. (2005):

„PCR“.

Standardarbeitsanweisung (PC/ID/013-3, Universitätsklinikum Heidelberg)

GEOGHEGAN J. A., CORRIGAN R. M., GRUSZKA D. T., SPEZIALE P., O’GARA J. P., POTTS J. R., FOSTER T. J. (2010):

Role of surface protein sasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 192(21):5663–5673

GEORGE N. P., KONSTANTOPOULOS K., ROSS J. M. (2007):

Differential kinetics and molecular recognition mechanisms involved in early versus late growth phase *Staphylococcus aureus* cell binding to platelet layers under physiological shear conditions.

J. Infect. Dis. 196:639–46

GIAMMARINARO P., LEROY S., CHACORNAC J. P., DELMAS J., TALON R. (2005):

Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level.

J. Clin. Microbiol. 43:3673–3680

GIBBONS J. F., MARKEYA B. K., JAHNSA H., ET AL. (2013):

Investigation of the persistence and transmission of MRSA CC 5 in pigs following intra-nasal inoculation.

Vet. Microbiol. 162:2–4

GILLET Y., ISSARTEL B., VANHEMS P., ET AL. (2002):

Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients.

Lancet 359:753–759

GLADSTONE G. P., VAN HEYNINGEN W. E. (1957):

Staphylococcal leucocidins.

Br. J. Exp. Pathol. 38:123–137

GOLDING G. R., BRYDEN L., LEVETT P. N., MCDONALD R. R., ET AL. (2010):

Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in humans,

Canada.

Emerg. Infect. Dis. 16(4) Doi: 10.3201/eid1604.091435

GOMEZ M. I., LEE A., REDDY B., MUIR A., SOONG G., PITT A., CHEUNG A., PRINCE A. (2004):

Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.

Nat. Med. 10:842–848

GORDON R. J., LOWY F. D. (2008):

Pathogenesis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection.

Clin. Infect. Dis. 46(5):350–359

GOUAUX J. E., BRAHA O., HOBAUGH M. R., SONG L., CHELEY S., SHUSTAK C., BAYLEY H. (1994):

Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12828–12831

GRAVELAND H., WAGENAAR J. A., BERGS K., HEESTERBEEK H., HEEDERIK D. (2011):

Persistence of LA-MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact.

PLoS ONE 6(2):e16830

GRAVELAND H., WAGENAAR J. A., HEESTERBEEK H., MEVIUS D., VAN DUIJKEREN E., HEEDERIK D. (2010):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene.

PLoS. One. 5:e10990

GRAY G. S., KEHOE M. (1984):

Primary sequence of the toxin gene from *Staphylococcus aureus*.

Infect. Immun. 46:615–618

GUILARDE A. O., TURCHI M. D., MARTELLI C. M. (2006):

Staphylococcus aureus bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in a Brazilian teaching hospital.

J. Hosp. Infect. 63:330-336

GUINANE C. M., BEN ZAKOUR N. L., TORMO-MAS M. A., ET AL. (2010):

Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation.

Genome Biol. Evol. 2:454-466

GUSS B., UHLEN M., NILSSON B., LINDBERG M., SJÖQUIST J., SJÖDAHL J. (1984):

Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A.

Eur. J. Biochem. 138:413-420

GUSTAFSON G. T., SIOQUIST J., STILENHEIM G. (1967):

Staphylococcus aureus.

J. Immunol. 98:1178

GUSTAFSON G. T., STALENHEIM G., FORSGREN A., SJOQUIST J. (1968):

Staphylococcus aureus.

J. Immunol. 100, 230

GUYONNET F., PLOMMET M. (1970):

Hémolysine gamma de *Staphylococcus aureus*: purification et propriétés.

Ann. Inst. Pasteur 118:19-33

HADDADIN A. S., FAPPIANO S. A., LIPSETT P. A. (2002):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit.

Postgrad. Med. J. 78:385-392

HAENNI M., CHA P., BOISSET S., ET AL. (2011):

Staphylococcal nasal carriage in calves: multiresistant *Staphylococcus sciuri* and immune evasion cluster (IEC) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398.

J. Antimicrob. Chemother. 66:1927–1928

HAHN H., MIKSITS K., GATERMANN S. (2001):

Staphylokokken.

In: Hahn F., D. Falke, S.H.E. Kaufmann, U. Ullmann:

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie,

Enke Verlag, Stuttgart:199–211

HAMAD A. R., MARRACK P., KAPPLER J. W. (1997):

Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins.

J. Exp. Med. 185:1447–1454

HARLIZIUS ET AL. (2008):

Prevalence of MRSA in pig-production units in north-rhine Westphalia, Germany.

IVVS (2008) Or.03,46

HARTLEIB J., KOHLER N., ET AL. (2000):

Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*.

Blood 96:2149–2156

HARTMAN B. J., TOMASZ A. (1984):

Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 158(2):513–516

HARTMANN F. A., TROSTLE S. S., KLOHNEN A. O. (1997):

Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 211:590–592

HASMAN H., MOODLEY A., GUARDABASSI L., STEGGER M., SKOV R. L., AERESTRUP F.M. (2010):

Spa-type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry.

Vet. Microbiol. 141:326–331

HAUSSCHILD R., ET AL (2012):

Detection of the novel *vga(E)* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates from cattle and poultry.

J. Antimicrob. Chemother. 67:503–504

HAVAEI S. A., MOGHADAM S. O., POURMAND M. R., FAGHRI J. (2010):

Prevalence of genes encoding bi-component leukocidins among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Iranian J. Publ. Health 39(1):8–14

HEIMAN F. L., WERTHEIM E., WALSH R., ET AL. (2008):

Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans.

PLoS Medicine 5(1):e17

Hensler T., Köller M., Prévost G., Piémont, Y. König W. (1994):

GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated by the Pantone-Valentine Leukocidin from *Staphylococcus aureus*.

Infect. Immun. 62:5281–5289

HENTON M. M. (2004):

Staphylococcus aureus infections.

In: Coetzer J. A. W., Tustin R. C.,

Infectious diseases of livestock.

Oxford University Press, 3:1754–1757

HERDEGEN T., ET AL. (2008):

Kurzlehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.

Thieme, Stuttgart; Auflage: 1., Aufl. S. 32-40

HEROLD B. C., IMMERGLUCK L. C., MARANAN M. C., LAUDERDALE D. C., GASKIN R. E., BOYLE-VAVRA S., LEITCH C. D., DAUM R. S. (1998):

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk.

J. Amer. Med. Assoc. 279(8):593–598

HERRON-OLSON L., FITZGERALD J. R., MUSSER J. M., ET AL. (2007):

Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*.

PLoS One 2:e1120

HILDEBRAND A., ROTH M., BHAKDI S. (1991):

Staphylococcus aureus alpha-toxin: dual mechanisms of binding to target cells.

J. Biol. Chem. 266:17195–17200

HIRAMATSU K., CUI I., KURODA C., ITO H. (2001):

The emergence and evolution of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Trends Microbiol. 9:486–493

HISATA, K., KUWAHARA-ARAI K., YAMANOOTO M., ITO T., NAKATOMI Y., CUI L., BABA T., TERASAWA M., SOTOZONO C., KINOSHITA S., YAMASHIRO Y., HIRAMATSU K. (2005):

Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children.

J. Clin. Microbiol. 43:3364–3372

HORGAN M., ABBOTT Y., LAWLOR P., ROSSNEY P., COFFEY A., FITZGERALD G., MCAULIFFE O., PAUL ROSS R. (2011):

A study of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and in personnel involved in the pig industry in Ireland.

Vet. J. 190:255–259

HUBER H., KOLLER S., GIEZENDANNER N., STEPHAN R., ZWEIFEL C. (2009):

Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals in livestock and in food of animal origin in Switzerland 2009.

Euro. Surveill. 15:1–4

HULETSKY A., GIROUX R., ROSSBACH V., GAGNON M., ET AL. (2004):

New real-time PCR assay for rapid *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci.

J. Clin. Microbiol. 42(5):1875–1884

HÜRLIMANN-DALEEL R. L., RYFFEL C., KAYSERF. H., BERGER-BÄCHI U. B. (1992):

Survey of the methicillin-resistance associated gens *mecA*, *mecR1-mecI* and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 36:2617–2621

HUSSAIN Z., STOAKES L., GARROW S., LONGO S., FITZGERALD V., LANNIGAN R. (2000):

Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative *coagulase*negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex-agglutination test.

J. Clin. Microbiol. 38:2051–2054.

IDUSOGIE E. E., PRESTA L. G., GAZZANO-SANTORO H., TOTPAL K., WONG P. Y., ET AL. (2000):

Mapping of the C1 binding site on rituxan, achimeric antibody with a human IgG 1Fc.

J.Immunol. 164:4178–4184

ITO T., KATAYAMA Y., ASADA K., MORI N., TSUTSUMIMOTO K., TIENSASITORN C., HIRAMATSU K. (2001):

Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 45:1323–1336

ITO T., KATAYAMA Y., HIRAMATSU K. (1999):

Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315.

Antimicrob. Agents Chemother. 43:1449–1458

ITO, T., MA X.X., TAKEUCHI F., OKUMA K., YUZAWA H., HIRAMATSU K. (2004):

Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase *ccrC*.

Antimicrob. Agents Chemother. 48:2637–2651

ITOH S., ET AL. (2010):

Staphylococcal superantigen-like protein10 (*ssl10*) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway.

Mol. Immunol. 47:932–938

JAMROZY D., SHARMA M., FIELDER M., KELLY A., ET AL. (2012):

Comparative genotypic and phenotypic characterisation of human and animal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type (ST) 398 using DNA microarrays.

ECCMID, Poster session 2012, P028

JARRAUD S., LYON G. J., FIGUEIREDO A. M., GERARD L., VANDENESCH F., ETIENNE J., MUIR T. W., NOVICK R. P. (2000):

Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 182:6517–6522

JARRAUD S., MOUGEL C., THIOULOUSE J., LINA G., MEUGNIER H., FOREY F., NESME X., ETIENNE J., VANDENESCH F. (2002):

Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr*-groups (alleles) and human disease.

Infect. Immun. 70:631–641

JI G., BEAVIS R., NOVICK R. P. (1997):

Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants.

Science 276:2027–2030

JUHÁSZ-KASZANYITZKY É., SZILÁRD J., SOMOGYI P., DÁN A., VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L., VAN DUIJKEREN E., WAGENAART J.A. (2007):

MRSA transmission between cows and humans.

Emerg. Infect. Dis. 13(4):630–632

KADLEC K., EHRLICH R., MONECKE S., STEINACKER U., KASPAR H., MANKERTZ J., SCHWARZ S. (2009):

Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine

J. Antimicrob. Chemother. 64:1156–1164

KAHL B., HERRMANN M., SCHULZE-EVERDING A., ET AL. (1997):

Persistent infection with small colony variants of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis.

J. Infect. Dis. 177:1023–1029

KAHL, B. C., MELLMANN A., DEIWICK S., PETERS G., HARMSSEN D. (2005):

Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 43:502–505

KANEKO J., KAMIO J. (2004):

Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism and organization of the genes.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(5):981–1003

KATAYAMA Y., BABA T., SEKINE M., FUKUDA M., HIRAMATSU K. (2013):

Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 195(6):1194–203

KATAYAMA Y., ITO T., HIRAMATSU K. (2000):

A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 44:1549–1555

KATAYAMA Y., TAKEUCHI F., ITO T., MA X. X., UI-MIZUTANI Y., KOBAYASHI I., HIRAMATSU K. (2003):

Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 185:2711–2722

KAYSER F. H. (1998):

Ursprung und Evolution der Antibiotikaresistenz.

Verein Forschung für Leben. Zürich, Nr. 51

KAYSER F. H., ET AL. (2001):

Allgemeine Bakteriologie.

In: Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R.

Medizinische Mikrobiologie

Thieme Verlag, Stuttgart, 10:161–165

KELLER C., BRÜGGEMANN C., NATHAUS R., WILKES H., OHLINGER F. H. (2010):

Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swabs and broncho alveolar lavage fluid from flatdeck and fattening pigs in northwest Germany.

Proceedings of the 21 IPVS Congress, Vancouver, Canada, P: 949

KAZAKOVA S. V., HAGEMAN J. C., MATAVA M., ET AL. (2005):

A clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players.

N. Engl. J. Med. 352:468–75

KEHRENBURG C., NÖDING V., SCHWARZ S. (2005):

Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558.

Antimicrob. Agents Chemother. 2(49):813–815

KEHRENBURG C., SCHWARZ S. (2006):

Aktuelle Daten zur Florfenicolempfindlichkeit bei Zielorganismen und Kommensalen.

DVG, 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft Ausgabe: „Antibiotikaresistenz“

KERRIGAN S. W., CLARKE N., LOUGHMAN A., MEADE G., FOSTER T. J., COX D. (2008):

Molecular basis for *Staphylococcus aureus*-mediated platelet aggregate formation under arterial shear in vitro.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28:335–340.

KHANNA T., FRIENDSHIP R., DEWEY C., WEESE J.S. (2008):

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers.

Vet. Microbiol. 128:298–303

KIPP F., BECKER K., PETERS G., VON EIFF C. (2004):

Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small colony variants of *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 42(3):1277–1279

KIPP F., FRIEDRICH A. W., BECKER K., VON EIFF C. (2004):

Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter Staphylococcus-aureus-Stämme: Strategien zur Kontrolle und Prävention in Deutschland.

Dtsch. Ärztebl. 101: A 2045-2050

KIPP F., KAHL B. C., BECKER K., ET AL. (2005):

Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small colony variants.

J.Clin. Microbiol. 43(4):1956–1959

KLOOS W. E., BANNERMAN T. L. (1999):

Staphylococcus and Micrococcus.

In: Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H.

Manual of Clinical Microbiology.

American Society for Microbiology, Washington, D.C 7:264–282

KLOOS W. E., SCHLEIFER K. H. (1986):

Staphylococcus.

Bergey's Manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore 1:1016–1017

KLUYTMANS J., VAN BELKUM A., VERBRUGH H. (1997):

Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks.

Clin. Mikrobiol. Rev. 10:505–520

KNIEHL E. (2006):

Nachweis Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) im Routinelabor.

Chemother. 15:152–161

KOBAYASHI N., WU H., KOJIMA K., ET AL. (1994):

Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction.

Epidemiol. Infect. 113:259–266

KOECK R., ET AL. (2010):

Prevalence of MRSA CC398 in pig holdings and human hospital patients in North Rhine Westphalia, Germany.

21. IPVS congress: O:085

KÖCK R., HARLIZIUS J., BRESSAN N., LAERBERG R., WIELER L. H., WITTE W., DEURENBERG R. H., VOSS A., BECKER K., FRIEDRICH A. W. (2009):

Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28:1375–1382

KÖECK R., LOTH B., KÖKSAL M., SCHULTE-WÜLWER J. ET AL. (2012):

Persistence of nasal colonization with livestock-associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in pig farmers after holidays from pig exposure.

Appl. Environ. Microb. 78(11):4046–4047

KÖECK R., SIAM K., AL-MALAT S., ET AL. (2011):

Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones.

J. Hosp. Infect. 79:292–296

KÖEENIG B., PRÉVOST G., PIÉMONT Y., KÖNIG W. (1995):

Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes.

J. Infect. Dis. 171:607–613

KÖEHLER B., WILLE H. (1980):

Bakteriologische Untersuchungen bei abortierten Schweinefeten unter besonderer Berücksichtigung der ätiologischen Bedeutung *Staphylococcus aureus*.

Mh. Vet.-Med. 35:506–510

KOLBERT C. P., ARRUDA J., VARGA-DELMORE P., ZHENG X., LEWIS M., KOLBERG J., PERSING D. H. (1998):

Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci.

J. Clin. Microbiol. 36:2640–2644

KOLLE W., HETSCH H. (1906):

Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre.

In: Urban, Schwarzenberg

Ein Lehrbuch für Studierende, Ärzte und Medizinalbeamte

Berlin: Urban & Schwarzenberg 3:20–29

KOLLE W., HETSCH H. (1913):

Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre.

In: Urban, Schwarzenberg

Medizinische Mikrobiologie

Berlin: Springer Verlag, 2:21–29

**KONDO Y., ITO T., MA X. X., WATANABE S., KREISWIRTH B. N., ETIENNE J.,
HIRAMATSU K., (2006):**

Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, *ac*, and major differences in junkyard regions.

Antimic. Agents and Chemoth. 1:264-274

KORCZAK B., FREY J., SCHRENZEL J., ET AL. (2005):

Use of diagnostic microarrays for determination of virulence gene patterns of *Escherichia coli* K1, a major cause of neonatal meningitis.

J. Clin. Microbiol. 43:1024–1031

KROKER R., SCHERKL R., UNGEMACH F. R. (2002):

Chemotherapie bakterieller Infektionen.

In: Frey H. H., Löscher W.

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin

Enke Verlag, 2:353–393

KRÜEGER M., SEIDLER T. (2007):

Allgemeine Bakteriologie.

In: Rolle M, Mayr A., Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

Enke Verlag, Stuttgart 8:344–392

KURODA M., OHTA T., UCHIYAMA I., O T., YUZAWA H., ET AL. (2001):

Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Lancet 357:1225–1240

KWON N. H., PARK K. T., MOON J. S., JUNG W. K., KIM S. H., KIM J. M., HONG S. K, KOO H. C., PARK Y. H. (2005):

Staphylococcal cassette chromosome mec (*SCCmec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel *SCCmec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea.

J. Antimicrob. Chemother. 56:624–632.

LANGLEY R., ET AL. (2005):

The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc RI binding and serum killing of bacteria.

J.Immunol. 174:2926–2933

LAURENT F., JOUY E., GRANIER S., ET AL. (2009):

Molecular characterization of antimicrobial resistance genes and virulence genes by using microarrays in representative ST398 MRSA isolates from pigs in France.

ASM-ESCMID 2009, Abstract Session 5:2

LEE K. H., FITTON J. E., WUTHRICH K. (1987):

Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of delta-haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles.

Biochim. Biophys. Acta 911:144–153

LEE S. M., ENDER M., ADHIKARI R., ET AL. (2007):

Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture.

Antimicrob. Agents. Chemother. 51:1497–1499

LIMBAGO B., ET AL. (2009):

Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in 2005 and 2006 from patients with invasive disease: a population-based analysis.

J. Clin. Microbiol. 47:1344–1351

LINA G., BOHACH G. A., NAIR S. P., HIRAMATSU K., JOUVIN-MARCHE E., MARIUZZA R. (2004):

Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*.

J. Infect. Dis. 189:2334–2336

LINA G., PIÉMONT Y., GODAIL-GAMOT F., BES M., PETER M. O., GAUDUCHON V., VANDENESCH F., ETIENNE J. (1999):

Involvement of Panton-Valentine-Leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia.

Clin. Inf. Dis. 29:1128–32

LINDE H., LEHN N. (2005):

Infektionen mit methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*: Bedeutung des Pathogenitätsfaktors Panton-Valentine Leukozidin.

Dtsch. Med. Wochenschr. 130:2397–2401

LINDSAY J. A. (2010):

Variation and evolution of *Staphylococcus aureus*.

Int. J. Med. Microbiol. 300:98–103

LINDSAY J. A., HOLDEN M. T. (2006):

Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*.

Funct. Integr. Genomics. 6:186–201

LINDSAY J. A., RUZIN A., ROSS H. F., KUREPINA N., NOVICK R. P. (1998):

The gene for toxic shock toxin: It is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*.

Mol. Microbiol. 29:527–543

LODE H., STAHLMANN R. WITTE W. (2010):

Infektionen mit multiresistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA): Daten zur Epidemiologie, Diagnostik, Klinik und Therapie.

ZETT Verlag: Sonderausgabe 2010

LOEFFLER A., LLOYD D. H. (2010):

Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community?

Epidemiol. Infect. 138:595–605

LONG K., POEHLSCGAARD J., KEHRENBURG C., SCHWARZ S., VESTER B. (2006):

The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins and streptogramin-A antibiotics.

Antimicrob. Agents Chemother. 7(50):2500–2505

LOUIE, L., GOODFELLOW J., MATHIEU P., GLATT A., LOUIE M., SIMOR A. E. (2002):

Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay.

J. Clin. Microbiol. 40:2786–2790

LOZANO C., ASPIROZ C., EZPELETA A. I., GOMEZ-SANZ E., ZARAZAGA M., TORRES C. (2011):

Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain.

Emerg. Infect. Dis. 17:138–140

LOZANO C., ASPIROZ C., LASARTE J. J., GOMEZ-SANZ E., ZARAZAGA M., TORRES C. (2011a):

Dynamic of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and ST1 after mupirocin treatment in a family in close contact with pigs.

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 34:1–7

LYON B. R., SKURRAY R. (1987):

Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis.

Microbiol. Rev. 51(1):88-134

MA X. X., ITO T., TIENSASITORN C., JAMKLANG M., CHONGTRAKOOL P., BOYLE-VAVRA S., DAUM R. S., HIRAMATSU K. (2002):

Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

Antimicrob. Agents Chemother. 46:1147–1152

MAES N., MAGDALENA J., ROTTIERS S., DE GHELDRE Y., STRUELENS M.J. (2002):

Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures.

J. Clin. Microbiol. 40(4):1514

MAIDEN M. C., BYGRAVES J. A., FEIL E., MORELLI G., RUSSELL J. E., URWIN R., ZHANG Q., ZHOU J., ZURTH K., CAUGANT D. A., FEAVERS I. M., ACHTMAN M., SPRATT B. G (1998):

Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3140–3145

MALHOTRA-KUMAR S., ABRAHANTES J. C., SABIITI W., LAMMENS C., VERCAUTEREN G., IEVEN M., MOLENBERGHS G., AERTS M., GOOSSENS H. (2010):

Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 48(4):1040-1046

MARRACK P., KAPPLER J. (1990):

The staphylococcal enterotoxins and their relatives.

Science 248:705–711

MATSUHASHI M., SONG M. D., ISHIMOTO F., WACHI M., DOI M., INOUE M., UBUKATA K., YAMASHITA N., KONNO M. (1986):

Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 167:975–980

MATTHEWS P., TOMASZ A. (1990):

Insertional inactivation of the *mec* gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 34:1777–1779

MCCARTHY A. J., ET AL. (2011):

The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country.

Genome Biol. Evol. 3:1164–1174

MCCARTHY A. J., LINDSAY J. A. (2010):

Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface research article and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions.

BMC Microb. 10:173

MCCARTHY A. J., WITNEY A. A., LINDSAY J. A. (2012):

Staphylococcus aureus temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated

Front. Cell. Inf. Microbiol. 2:6

MCNAMARA P. J., PROCTOR R. A. (2000):

Staphylococcus aureus small colony variants, electron transport and persistent infections.

Int. J. Antimicrob. Agents 14(2):117–122

MELISH M., FUKUNAGA C., MURATA S. (1998):

TSST-1 dissemination in a vaginal model for TSS.

In: Arbuthnott J., Furman B.

European Conference on Toxic Shock Syndrome. Royal Society of Medicine Press Ltd., N.Y.1:169

MELLOR I. R., THOMAS D. H., SANSOM M. S. P. (1988):

Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus*-toxin.

Biochim. Biophys. Acta. 942:280–294

MEEMKEN D., CUNY C., WITTE W., EICHLER U., STAUDT R., BLAHA T. (2008):

Zum Vorkommen von MRSA bei Schweinen und bei Menschen mit beruflicher Exposition zum Schwein.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 115:132–139

MEMMKEN D., ET AL. (2008a):

Occurrence of MRSA in Pigs in the Northwest of Germany.

21. IPVS Congress 2008, OR:03.49

MEMMKEN D., ET AL. (2010):

Longitudinal study on the colonisation dynamics of MRSA ST398 in two German pig herds.

21. IPVS Congress, P.647

MERLINO J., LEROI M., BRADBURY R., VEAL D., HARBOUR H. (2000):

New chromogenic identification and detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*.

J. Clin. Microbiol. 38:2378–2380

MEUNIER O., FALKENRODT A., MONTEIL H., COLIN D. A. (1995):

Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*.

Cytometry 21:241–247

MILLER K., DUNSMORE C. J., FISHWICK C. W. G., CHOPRA I. (2008):

Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center.

Antimicrob. Agents Chemother. 5(52):1737– 1742

MODUL MRSA-KISS (2011):

Referenzdaten/<http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/mrsa/MRSASReferenz2011.pdf>

MOISE-BRODER P. A., SAKOULAS G., ELIOPOULOS G. M., SCHENTAG J. J., FORREST A., MOELLERING JR. R.C. (2004):

Accessory gene regulator group-II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy.

Clin. Infect. Dis. 38:1700–1705

MONACO M., SANCHINI A., GRUNDMANN H., PANTOSTI A. (2010):

Vancomycin-hetero resistant phenotype in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to *spa*-type 041.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 29:771-777

MONECKE S., EHRLICH R. (2005):

Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using resistant *Staphylococcus aureus* using miniaturised oligonucleotide arrays.

Clin. Microbiol. Infect. 11:825–833

MONECK S., ET AL. (2008):

Charakterisierung von MRSA Isolaten mit diagnostischen DNA-Microarrays.

Mikrobiologie 18:107–114

MONECKE S., JATZWALK L., WEBER S., SLICKERS P., EHRLICH R. (2008a):

DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony.

Clin. Microbiol. Infect. 14:534–545

MONECKE S., KUHNERT P., HOTZEL H., SLICKERS P., EHRLICH R. (2007):

Microarray-based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle.

Vet. Microbiol. 125:128–140

MONECKE S., LEUBE I., EHRLICH R. (2003):

Simple and robust array based methods for the parallel detection of resistance genes of *Staphylococcus aureus*.

Genome Lett. 2:106–118

MONECKE S., SLICKERS P., EHRLICH R. (2008b):

Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53:237–251

MOODLEY A., ESPINOSA-GONGORA C., NIELSEN S. S., MCCARTHY A. J., LINDSAY J. A., ET AL. (2012):

Comparative host specificity of human- and pig-associated *Staphylococcus aureus* clonal lineages.

PLoS ONE 7(11):e49344

MOODLEY A., LATRONICO F., GUARDABASSI L. (2010):

Experimental colonization of pigs with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): insights into the colonization and transmission of livestock-associated MRSA.

Epidemiol. Infect. 12:1–7

MORCILLO A., CASTRO B., RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ C., GONZÁLEZ J. C., SIERRA A., MONTESINOS M. I., ABREU R., ARIAS A. (2010):

Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in swine and swine workers in Tenerife, Spain.

Foodborne Pathog. Dis. 9(3):207–210

MORGAN M. (2007):

Diagnosis and treatment of Panton-Valentine leukocidin (PVL) -associated staphylococcal pneumonia.

J. Antimicrob. Agent. 30:289–296

MORGAN M. (2008):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis?

J. Antimicrob. Chemother. 62:1181–1187

MULDERS M. N., HAENEN A. P., GEENEN P. L., VESSEUR P. C., ET AL. (2010):

Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in the Netherlands.

Epidemiol. Infect. 138:743–755

MURPHY M. W., SANDERSON W. T., VARGO J. D. (2007):

Airborne antibiotic concentrations in a swine feeding operation.

J. Agric. Saf. Health 13:309–322

NACCARI F., FOTI M., GIACOPELLO C., MARIAVITALE P., PASSANTINO A, RUSSO C, CONTE F. (2009):

Methicillin-resistant *Staphylococcus* sp isolated from donkey's milk in Sicily: preliminary study.

J. Vet. Pharmacol. Ther. 32:150

NAIMI S., LEDELL H., COMO-SABETTI K., BORCHARDL M., ET AL. (2003):

Comparison of community and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection.

J. Amerc. Med. Assoc. 290:2976–2984

NATHAUS R., BLAHA T., TEGELER R., MEEMKEN D. (2010):

Intra-Herdenprävalenz und Kolonisationsdynamik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* in zwei Schweinezuchtbeständen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 123:221–228

NATHAUS R., ET AL. (2011):

Zum Einsatz von Staubmasken zur Senkung der MRSA-Exposition von Tierärzten in der Bestandsbetreuung von Schweinebeständen –eine Pilotstudie.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 124:128–135

NEMATİ M., HERMANS K., LIPINSKA U., DENIS O., DEPLANO A., STRUELENS M., DEVRIESE L.A., PASMANS F., HAESBROUCK F. (2008):

Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398.

Antimicrob. Agents Chemother. 52:3817–3819

NOVICK R. P., LINDSAY J., RUZIN A., ROSS H. (1998):

Molecular genetics of the *tst*-element, a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*.

In: Arbuthnott J., Furman B.,

European Conference on Toxic Shock Syndrome, Royal Society of Medicine Press Ltd.:1:109–112

NOVICK R. P., SUBEDI A. (2007):

The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*.

Chem. Immunol. Allergy 93:42–57

O'BRIEN F. G., LIM T. T., CHONG F. N., ET AL. (2004):

Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia.

J. Clin. Microbiol. 42:3185–3190

O'BRIEN F. G., PEARMAN J. W., GRACEY M., RILEY T. V., GRUBB W. B. (1999):

Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak.

J. Clin. Microbiol. 37:2858–2862

OJO M. O. (1972):

Bacteriophage types and antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from swabs from the noses and skins of dogs.

Vet. Rec. 91:152–153

OLIVEIRA D. C., CRISOSTOMO I., SANTOS-SANCHES I., ET AL. (2001a):

Comparison of DNA sequencing of the protein A gene polymorphic region with other molecular typing techniques for typing two epidemiologically diverse collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 39:574–580

OLIVEIRA D. C., TOMASZ A., LENCASTRE H. (2001):

The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements.

Microb. Drug Resist. 7:349–361

O'MAHONY R., ABBOTT Y., LEONARD F. C., MARKEY B. K., QUINN P. J., POLLOCK P. J., FANNING S., ROSSNEY A. S. (2005):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland.

Vet. Microbiol. 109:285–296

O'REILLY M., KREISWIRTH B. N., FOSTER T. J. (1990):

Molecular analysis of a nonexpressed-toxin gene (hla) of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.

In: Novick R. P.

Molecular biology of the staphylococci.

VCH Publishers Inc. New York, N.Y.:1:439–443

OTTEN M. A., VAN EGMOND M. (2004):

The Fc receptor for IgA (Fc RI, CD89) established under the Australian government's major national research.

Immunol. Lett. 92:23

OVERESCH G., BÜTTNER S., ROSSANO A., PERRETEN V. (2011):

The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland.

BMC Vet. Res. 7:30

PAINTSIL E. (2007):

Pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and colonization: trends and management.

Curr. Opin. Pediatr. 19(1):75–82

PAK S. J., HAN H. R., SHIMIZU A. (1999):

Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea.

J. Vet. Med. Sci. 61:1013–1018

PALMA M., NOZOHOOOR S., SCHENNINGS T., HEIMDAHL A., FLOCK J.-I. (1996):

Lack of the extracellular 19-kilodalton fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* decreases virulence in experimental wound infection.

Infect. Immun. 64(12):5284–5289

PAN A., BATTISTI A., ZONCADA A., ET AL. (2009):

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus* ST398 aureus infection, Italy.

Emerg. Infect. Dis. 15:5

PANTON P. N., VALENTINE F. C. O. (1932):

Staphylococcal toxin.

Lancet 222:506–508

PANTOSTI A. (2012):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health.

Front. Microb. doi:10.3389

PARSONNET J. (1998):

Case definition of staphylococcal TSS: A proposed revision incorporating laboratory findings.

In: Arbuthnott J., Furman B.

European Conference on Toxic Shock Syndrome, International Congress and Symposium:p.15

PEARMAN J. W. (2002):

Community-acquired MRSA: the Australian experience.

Program and abstracts of the 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (Tsukuba, 31. Japan), Tokyo:

Japanese Association for Infectious Diseases, 2002:18

**PERSOONS D., VAN HOOREBEKE S., HERMANS K., BUTAYE P., DE KRUIF A.,
HAESEBROUCK F., DEWULF J. (2009):**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry.

Emerg. Infect. Dis. 15:452–453

PIEPERS S., DE MEULEMEESTER L., DE KRUIF A., OPSOMER G., BARKEMA H. W., DE VliegHER S. (2007):

Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium.

J. Dairy Res. 74 :478-483

PINHO M. G., FILIPE S. R., DE LENCASTRE H., TOMASZ A. (2001):

Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *S. aureus*

J. Bacteriol. 183, 6525-6531

PISHCHANY G., MCCOY A. L., TORRES V. J., ET AL. (2010):

Specificity for human hemoglobin enhances *Staphylococcus aureus* infection.

Cell. Host. Microbe. 8:544–50

PLOMMET M. (1988):

Preparation and purification of hemolysin of staphylococci.

Methods. Enzymol. 165:8–16

POHL S., MISCHNIK A., SONNTAG H.-G. (2001):

Oxidase-Test.

Standardarbeitsanweisung (VA/ID/009-2, Uniklinikum Heidelberg), 1:1–7

POPOVICH K. J., WEINSTEIN R. A., POPOVICH K. J., ET AL. (2009):

Commentary: the graying of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 30(1):9–12

POTEL C., ALVAREZ M., ALVAREZ P., OTERO I., FLUITERS E. (2012):

Evolution, antimicrobial susceptibility and assignment to international clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 9-year period in two Spanish hospitals.

Clin. Microbiol. Infect. 13(7):728–30

POULSEN A. B., SKOV R., PALLESEN L. V. (2003):

Detection of methicillin resistance in *coagulase* negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the Evigene MRSA detection kit.

J. Antimicrob. Chemother. 51:419–421

PREVOST G., COUPPIE P., PREVOST P., ET AL. (1995):

Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins.

J. Med. Microbiol. 42:237–45

PREVOST G., CRIBIER B., COUPPIE P., ET AL. (1995a):

Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities.

Infect. Immun. 63:4121–9

PRÉVOST G., SUPERSAC G., COLIN D., ET AL. (1994):

The new family of leucotoxins from *Staphylococcus aureus*: structural and biological properties.

In: Freer J., Aitken R., Alouf J. E.

Zentralbl. Bakteriол., Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 24:284–93

PROCTOR R. A., KAHL B., VON EIFF C., VAUDAUX P. E., LEW D. P., PETERS G. (1998):

Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance.

Clin. Infect. Dis. 27(1):68–74

PROCTOR R. A., VON EIFF C., KAHL B. C., BECKER K., MCNAMARA P., ET AL. (2006):

Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infection.

Nat. Rev. Microb. 4:295–305

PRICE L.B., STEGGER M., HASMAN H., ET AL. (2012):

Staphylococcus aureus CC398: Host adaptation and emergence of methicillin-resistance in Livestock.

mBio 3(1):e00305-11

QUINN P. J., MARKEY B. K., CARTER M. E., DANNELLY W. J., LEONARD F. C. (2002):

Section II Pathogenic Bacteria: *Staphylococcus* species.

In: Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Dannelly W. J., Leonard F. C.

Veterinary Microbiology and Microbial Disease

Blackwell Science: 2:43–48

RASIGADE J. P., LAURENT F., HUBERT P., VANDENESCH F., ETIENNE J. (2010):

Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain.

Emerg. Infect. Dis. 16:1330

RASSCHAERT G., VANDERHAEGHEN W., DEWAELE I., JANEZ N., HUIJSDENS X., BUTAYE P., HEYNDRIKX M. (2009):

Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398.

J. Clin. Microbiol. 47:3313–3322

RECSEI P., KREISWIRTH B., O'REILLY M., SCHLIEVERT P., GRUSS A., NOVICK R. P. (1986):

Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*.

Mol. Gen. Genet. 202:58–61

REGELMANN W. E., GRAY E. D., WANNAMAKER L. W. (1982):

Characterization of the human cellular immune response to purified group A streptococcal blastogen.

A. J. Immunol. 128:1631–1636

REINGOLD A. L., HARGRETT N. T., DAN B. B., SHANDS K. N., STRICKLAND B. Y., BROOME C. V. (1982):

Nonmenstrual toxic shock syndrome: a review of 130 cases.

Ann. Intern. Med. 96:871–874

REISCHL U., FRICK J., HOERMANSDORFER S., MELZL H., BOLLWEIN M., LINDE H. J., BECKER K., KÖCK R., TUSCHAK C., BUSCH U., SING A. (2009):

Single-nucleotide polymorphism in the *SCCmec-orfX* junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains.

Euro Surveill. 14(49):pi19436

REYNOLDS P. E., BROWN D. F. J. (1985):

Penicillin-binding proteins of beta-lactam resistant strains of *Staphylococcus aureus*.

FEBS Lett. 192:28–32

RICH M., ET AL. (2005):

Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Br. J. Biomed. Sci. 62(2):98–105

ROBERT J., ETIENNE J., BERTRAND X. (2005):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prucing Panton-Valentine leucocidine in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories , 2000-2003.

Clin. Microbiol. Infect. 11 :585–587

ROBERT J., TRISTAN A., CAVALIE L., ET AL. (2011):

Panton-Valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008.

Antimicrob. Agents. Chemother. 55:1734–1739

ROBINSON D. A., ENRIGHT M. C. (2004):

Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Clin. Microbiol. Infect. 10:92–97

ROBINSON D. A., MONK A. B., COOPER J. E., FEIL E. J., ENRIGHT M. C. (2005):

Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus aureus*.

J. Bacteriol. 187:8312–8321

ROCHE M., MEEHAN M., FOSTE J. (2003):

The *Staphylococcus aureus* surface protein *sasG* and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells.

Microbiology 149:2759–2767

ROHRER, S., TSCHIERKE M., ZBINDEN R., BERGER-BACHI B. (2001):

Improved methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20:267–270

ROOIJAKKERS S. H. M., RUYKEN M., ROOS A., DAHA M. R., PRESANIS J. S., SIM R. B., VANWAMEL W. J. B., VAN KESSEL K. P. M., VAN STRIJP J. A. G. (2005):

Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases.

Nat. Immun. 6(9):920-927

SAKOULAS G., ELIOPOULOS G. M., MOELLERING R. C., ET AL. (2002):

Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin.

Antimicrob. Agents Chemother. 46:1492–1502

SAKOULAS G., ELIOPOULOS G. M., MOELLERING R. C., NOVICK R. P., VENKATARAMAN L., WENNERSTEN C., DE GIROLAMI P. C., SCHWABER M. J., GOLD H. S. (2003):

Staphylococcus aureus accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development.

J. Infect. Dis. 187: 929–938

SALISBURY S.M., SABATINI L.M., SPIEGEL C.A. (1997):

Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay.

Am. J. Clin. Pathol. 107:368–373

SCHÄFER, M. (1998):

Glykopeptid Antibiotika: Kristallisation, Datensammlung und Strukturbestimmung.

Göttingen, Diss.

SCHEYER A. (2007):

Vitek2.

Standardarbeitsanweisung (VA/GE/008-8, Universitätsklinikum Heidelberg) 1:1–12

SCHIJFFELEN M. J., EDWIN BOEL C. H., VAN STRIJP J. A. G., FLUIT A. C. (2010):

Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis.

BMC Genomics. 11:376

SCHLEIFER K. H. (1986):

Staphylococcus.

In: Bergey

Manual of Systematic Bacteriology, 1:1035

SCHLIEVERT P. M. (1982):

Enhancement of host susceptibility to lethal endotoxin shock by staphylococcal pyrogenic exotoxin type-C.

Infect. Immun. 36:123–128

SCHLIEVERT P. M., BETTIN K. M., WATSON D. W. (1980):

Inhibition of ribonucleic acid synthesis by group A streptococcal pyrogenic exotoxin.

Infect. Immun. 27:542–548

SCHMID ET AL. (2011):

Limited value of routine *spa* typing: A cross-sectional study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-positive patients in an Austrian hospital.

Am. J. Infect. Control 41(7):617–624

SCHMITZ F. J., MACKENZIE C. R., HOFMANN B., VERHOEF J., FINKEN-EIGEN M., HEINZ H. P., KÖHRER K. (1997):

Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR.

J. Med. Microbiol. 46(9):773–8

SCHNEEWIND O., MODEL P., FISCHETTI V. A. (1992):

Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall.

Cell 70:267–281

SCHULTE-WUELWER J., KÖCK R., ET AL. (2010):

Screening pig farmers for MRSA in the Euregio-Region of Lower Saxony part of the MRSA-Safeguard-Project.

21. IPVS Congress, P:645

SCHULZ ET AL. (2010):

Efficiency of different sampling locations and methods to detect MRSA on pigs and their housing environment.

21. IPVS Congress, O:086

SELBITZ H.-J. (2007):

Bakterielle Krankheiten der Tiere.

In: Rolle M, Mayr A.

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Enke Verlag, Stuttgart 8. Auflage:481–558

SHANDS K. N., SCHMID G. P., DAN B. B., BLUM D., GUIDOTTI R. J., HARGRETT N. T., ANDERSON R. L., HILL D. L., BROOME C. V., BAND J. D., FRASER D. W. (1980):

Toxic-shock syndrome in menstruating women: its association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and the clinical features in 52 cases.

N. Engl. J. Med. 303:1436–1442

SHIMIZU A., KAWANO J., YAMAMOTO C., ET AL. (1997):

Genetic analysis of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsedfield gel electrophoresis.

J. Vet. Med. Sci. 59:935–937

SHOPSIN, B., GOMEZ M., MONTGOMERY S., SMITH D. H., ADDINGTON M., DODGE D. E., BOST D. A., RIEHMAN M., NAIDICH S., KREISWIRTH B. N. (1999):

Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains.

J. Clin. Microbiol. 37:3556–3563

SHORE A., ROSSNEY A. S., KEANE C. T., ENRIGHT M. C., COLEMAN D. C. (2005):

Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland.

Antimicrob. Agents Chemother. 49:2070–2083

SHURLAND S., ZHAN M., BRADHAM D. D. (2007):

Comparison of mortality risk associated with bacteremia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.

Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 28:273-279

SING A., TUSCHAK C., HÖRMANSDORFER S. (2008):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat.

N. Engl. J. Med. 385:1200–1201

SJÖQUIST J., FORSGREN A. (1967):

Staphylococcus aureus.

J. Immunol. 99:19

SJÖQUIST J., FORSGREN A. (1968):

Staphylococcus aureus, resistance.

J. Immunol. 100 :921

SKOV R., LARSON A. R., BÖCHER S., ET AL. (2005):

National surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Denmark, 1999-2003.

15th ECCMID Copenhagen 2005; Abs:0264

SMITH M. L., PRICE S. A. (1938):

Staphylococcus haemolysins.

J. Pathol. Bacteriol. 47:379–393

SMITH T. C., MALE M. J., HARPER A. L., KROEGER J. S., TINKLER G. P.,

MORITZ E. D., CAPUANO A. W., HERWALDT L. A., DIEKEMA D. J. (2009):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers.

Appl. Environ. Microbiol. 77(2):696–698

SMITH T. C., PEARSON N., ET AL. (2011):

Staphylococcus.

Vector-Borne Zoonot. 11(4):327–339

SONG M. D., WACHI M., DOI M., ISHINO F., MATSUHASHI M. (1987):

Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion.

FEBS Lett. 221:167–171

SPERO L., MORLOCK B. A., METZGER J. F. (1978):

On the cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins A, B, C1.

J. Immunol. 120:86–89

SPOHR M., RAU J., FRIEDRICH A., KLITTICH G., FETSCH A., GUERRA B., HAMMERL J. A., TENHAGEN B. A. (2011):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in Southwest Germany.

Zoo. Pub. Health 58:252–261

STAALI L., MONTEIL H., COLIN D. A. (1998):

The Staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca-channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils.

J. Membrane Biol. 162:209–216

STEGGER M., LINDSAY J. A., SØRUM M., GOULD K. A., SKOV R. (2010):

Genetic diversity in CC398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of different geographical origin.

Clin. Microbiol. Infect. 16(7):1017–9

STROMMINGER B., KEHRENBURG C., KETTLITZ C., CUNY C., VERSPOHL J., WITTE W., SCHWARZ S. (2006):

Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates.

J. Antimicrob. Chemother. 57:461–465

SUNDE M., ET AL. (2009):

Colonization and persistence of MRSA sequence type-8 (ST8) on a pig farm.

J. Vet. Diagn. Invest. 23:348–350

SUNDE M., THARALDSEN H., MARSTEIN L., HAUGUM M., NORSTRO M., JACOBSEN T., LIUM B. (2011):

Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 8 in pigs, production environment, and human beings.

J. Vet. Diagn. Invest. 23:348–350

SUNG J. M., LLOYD D. H., LINDSAY J. A. (2008):

Staphylococcus aureus host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray.

Microbiology 154:1949-1959

SUPERSAC G., PRÉVOST G., PIÉMONT Y. (1993):

Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxin.

Infect. Immun. 61:580–7

SUZUKI E., HIRAMATSU K., YOKOTA T. (1992).

Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution.

Antimicrob. Agents Chemother. 36:429–434

TAYLOR A. G., BERNHEIMER A. W. (1974):

Further characterization of staphylococcal gamma-hemolysin.

Infect. Immun. 10:54–59

TAYLOR D. J. (2006):

Miscellaneous bacterial infections.

In: Straw B. E.

Diseases of Swine

Blackwell Publishing 2:817–846

TENHAGEN B.-A., FETSCH A., ALT K., GUERRA B., HERTWIG S., HAMMERL J. A., KÄSBOHRER A., BRÄUNIG J., APPEL B. (2010):

MRSA in herds of fattening pigs in Germany: Typing results and factors associated with the detection on herds.

21. IPVS Congress, Vancouver, Canada, O:082

TENHAGEN B. A., FETSCH A., STUHRENBERG B., SCHLEUTER G., GUERRA B. (2009):

Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs.

Vet. Rec. 165:589–593

TENHAGEN B. A., KOSTER G., WALLMANN J. (2006):

Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany.

J. Dairy. Sci. 89:2542-2551

TODD J., FISHAUT M., KAPRAL F., WELCH T. (1978):

Toxic shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci.

Lancet 2(8100):1116–8

TRISTAN A., FERRY T., DURAND G., ET AL. (2006):

Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J. Hosp. Infect. 65(2):105–109

UDO E. E., PEARMAN J. W., GRUBB W. B. (1993):

Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia.

J. Hosp. Infect. 25:97–108

UHLEMANN A.-C., PORCELLA S. F., TRIVEDI S., SULLIVAN S. B., HAFFER C., KENNEDY A. D., ET AL. (2012):

Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties.

mBio 3(2):e00027-12

UHLÉN M., GUSS B., NILSSON B., GATENBECK S., PHILIPSON L., LINDBERG M. (1984):

Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A.

J. Biol. Chem. 259:1696-1702

UNAL S., HOSKINS J., FLOKOWITSCH J. E., WU C. Y. E., PRESTON D. A. (1992):

Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction.

J. Clin. Microbiol. 30:1685–1691

UTSUI Y., YOKOTA T. (1985):

Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*.

Antimicrob. Agents Chemother. 28:397–403

VALEVA A., PALMER M., BHAKDI S. (1997):

Staphylococcal exotoxin: formation of the heptameric pore is cooperative and proceeds through multiple intermediate stages.

Biochemistry 36:13298–13304

VAN BELKUM A., MELLES D. C., PEETERS J. K., VAN LEEUWEN W. B., VAN DUIJKEREN E., VERBRUGH (2008):

Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans.

Emerg. Infect. Dis. 14(3):479–483

VAN CLEEF B. A., GRAVELAND H., HAENEN A. P., VAN DE GIESSEN A. W., HEEDERIK D., WAGENAAR J. A., KLUYTMANS J. A. (2011):

Persistence of livestock-associated MRSA after short term occupational exposure to pigs and veal calves.

J. Clin. Microbiol. 49:1030-1033

VAN CLEEF B. A., VERKADE E., ET AL. (2010):

Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in the Netherlands.

PLoS ONE 5(2):e9385

VAN CLEEF B., VAN BENTHEM B., KLUYTMANS-VAN DEN BERGH M., VERKADE E., VAN RIJEN M., KLUYTMANS J. (2013):

Mouth masks prevent persistent carriage of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pig farmers: a prospective cohort study.

ECCMID 2013, Abstract O:411

VAN CLEEF B. A., VERKADE E., WULF M. W., BUITING A. G., VOSS A., ET AL. (2009):

Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in the Netherlands.

PLoS ONE 5(2):e9385

VANDENESCH F., NAIMI T., ENRIGHT M. C., ET AL. (2003):

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.

Emerg. Infect. Dis. 9:978–984

VANDERHAEGHEN W., CERPENTIER T., ADRIAENSEN C., VICCA J., HERMANS K., BUTAYE P. (2010):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows.

Vet. Microbiol. 144:166–217

VAN DE RIJN I., KESSLER R. E. (1980):

Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium.

Infect. Immun. 27:444–448

VAN DER MEE-MARQUET, ET AL. (2011):

Emergence of unusual bloodstream infections associated with pig-borne-like *Staphylococcus aureus* ST398 in France.

Clin. Infect. Dis. 52(1):152–153

VANDESCH F., NAIMI T., ENRIGHT M. C., LINA G., NIMMO G. R., HEFFERNAN H., LIASSINE N., BEST M., GREENLAND M., REVERDY M.-E., ETIENNE J. (2003):

Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence.

Emerg. Infect. Dis. 9:978-984

VAN DUIJKEREN E., IKAWATY R., BROEKHUIZEN-STINS M. J., JANSEN M. D., SPALBURG E. C., DE NEELING A. J., ALLAART J. G., VAN NES A., WAGENAAR J. A., FLUIT A. C. (2008):

Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms.

Vet. Microbiol. 126:383–389

VAN DUIJKEREN E., JANSEN M. D., ET AL. (2007):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis.

Emerg. Infect. Dis 13:1408–1410

VAN DUIJKEREN E., MOLEMAN M., SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN M. M., MULTEM J., TROELSTRA A., FLUIT A.C., ET AL. (2010):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks.

Vet. Microbiol. 141:96–102

VAN LEEUWEN W. B., JAY C., SNIJDERS S., DURIN N., LACROIX B., ET AL. (2003):

Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* with DNA array technology.

J. Clinic. Microbiol. 41(7):3323–3326

VAN LEEUWEN W. B., VAN PELT C., LUIJENDIJK A., VERBRUGH H. A., GOESSENS W. H. F. (1999):

Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-Screen latex agglutination test.

J. Clin. Microbiol. 37:3029–3030

VAN LOO I., HUIJSDENS X., TIEMERSMA E., DE NEELING A., VAN DE SANDEBRUINSMA N., BEAUJEAN D., VOSS A., KLUYTMANS J. (2007):

Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans.

Emerg. Infect. Dis. 13(12):1834–1839

VANNUFFEL P., GIGI J., EZZEDINE H., VANDERCAM B., DELMEE M., WAUTERS G., GALA J.-L. (1995):

Specific detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR.

J. Clin. Microbiol. 33(11):2864–2867

VAN RIJEN M. M., VAN KEULEN P. H., KLUYTMANS J. A. (2008):

Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farmin.

Clin. Infect. Dis. 46:261–263

VAN WAMEL W. J., ROOIJAKKERS S. H., RUYKEN M., VAN KESSEL K. P., VAN STRIJP J. A. (2006):

The immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin converting bacteriophages.

J. Bacteriol. 188:1310–1315

VERCAMMEN F., BAUWENS L., DE DEKEN R., BRANDT J. (2012):

Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mammals of the Royal Zoological Society of Antwerp, Belgium.

J. Zoo Wildlife Med. 43(1):159–161

VERDIER I., DURAND G., BES M., TAYLOR K. L., LINAG., VANDENESCH F., FATTOM A.I., ETIENNE J. (2007):

Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests.

J. Clin. Microbiol. 45:725–729

VERDIER I., REVERDY M. E., ETIENNE J., LINA G., BES M., VANDENESCH F. (2004):

Staphylococcus aureus isolates with reduced susceptibility to glycopeptides belong to accessory gene regulator group I or II.

Antimicrob. Agents Chemother. 48:1024–1027

VERKAIK N. J., BENARD M., BOELEN H. A., DE VOGEL C. P., NOUWEN J. L., ET AL. (2011):

Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains but they are not essential in the first stages of nasal colonization.

Clin. Microbiol. Infect. 17:343–348

VITALE C. B., GROSS T. L., WEESE J. S. (2006):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cat and owner.

Emerg. Infect. Dis. 12(12):1998–1999

VON EIFF C., BECKER K., MACHKA K., STAMMER H., PETERS G. (2001):

Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia.

N. Engl. J. Med. 344:11–16

VON EIFF C., PETERS G., BECKER K. (2006):

The small colony variant (SCV) concept: the role of staphylococcal SCVs in persistent infections.

Injury 37(2):26–33

VOSS A., LOEFFEN F., BAKKER J., KLAASSEN C. U. M., WULF W. (2005):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming.

Emerg. Infect. Dis. 11:1965–1966

WAAGE S., MØRK T., RØROS A., AASLAND D., HUNSHAMAR A., ODEGAARD A. S. (1998):

Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers.

J. Dairy Sci. 82:712–719

WAGENAAR J. A., YUE H., PRITCHARD J., BROEKHUIZEN-STINS M., HUIJSDENS X., MEVIUS D. J., BOSCH T., VAN DUIJKEREN E. (2009):

Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China.

Vet. Microbiol. 139(3-4):405–409

WALTHER B., WIELER L. H., FRIEDRICH A. W., HANSSEN A.-M., KOHN B., BRUNNBERG L., LÜBKE-BECKER A. (2008):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations.

Vet. Microbiol. 127:171–178

WARD P. D., TURNER W. H. (1980):

Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin.

Infect. Immun. 28:393–397

WARREN D. K., LIAO R. S., MERZ L. R., EVELAND M., DUNNE M., MICHAEL J. R. D. (2004):

Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay.

J. Clin. Microbiol. 42(12):5578

WASSENBERG M. W., BOOTSMA M. C., TROELSTRA A., KLUYTMANS J. A., BONTEN M. J. (2011):

Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals.

Clin. Microbiol. Infect. 17:316–319

WEESE J. S., ARCHAMBAULT M., WILLEY B. M., DICK H., HEARN P., KREISWIRTH B. N., SAID-SALIM B., MCGEER A., LIKHOSHVAY Y., PRESCOT J. F., LOW D. E. (2005):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000 – 2002.

Emerg. Infect. Dis. 11:430–435

WEESE J. S., ROUSSEAU J., WILLEY B. M., ARCHAMBAULT M., MCGEER A., LOW D. E. (2006):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization and association with clinical disease.

J. Vet. Intern. Med. 20:182–186.

WEESE J. S., ZWAMBAG A., ROSENDAL T., REID-SMITH R., FRIENDSHIP R.

(2010):

Longitudinal investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in piglets.

Zoo. Pub. Health 58(4):238-243

WELINDER-OLSSON C., FLOREN-JOHANSSON K., LARSSON L., OBERG S., KARLSSON L., AHREN C.(2008):

Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034.

Emerg. Infect. Dis. 14:1271–1272

WICHELHAUS T. A., KERN S., SCHAEFER V., BRADE V., HUNFELD K.-P. (1999):

Evaluation of modern agglutination tests for identification of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18:756–758

WIEDEMANN B., HEISIG P. (1999):

Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin).

Chemother. J. 3:99–107

WIELDERS C. L., VRIENS M. R., BRISSE S., GRAAF-MILTENBURG L. A., TROELSTRA A., FLEER A., SCHMITZ F. J., VERHOEF J., FLUIT A. C. (2001):

Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*.

Lancet 357:1674–1675

WITTE W., STOMMENDER B., STANEK C., CUNY C., ET AL. (2007):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in human and animals, Central Europe.

Emerg. Infect. 13(2):255-258

WILLIAMS R. E. O. (1963):

Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance.

Bacteriol. Rev. 27:56–71

WILLIAMS R. J., WARD J. M., HENDERSON B., POOLE S., O'HARA B. P., WILSON M., NAIR S. P. (2000):

Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: Characterization of the prototypic gene and its protein product, set1.

Infect. Immun. 68:4407–4415

WOODIN A. M. (1959):

Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*.

Biochem. J. 73:225–23

WOODIN A. M. (1960):

Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*.

Biochem. J. 75:158–165

WOODIN A. M. (1970):

Staphylococcal leukocidin.

In: Montje T. C., Kadis S., Ajl S. J.

Microbial toxins

Vol. 3. Academic Press Inc.; New York:327–355

WOODIN A.M. (1972):

The staphylococcal leukocidin

In J.O. Cohen (ed.), The staphylococci; Wiley Interscience 1:281–289

WRIGHT J.S., ET AL. (1982):

The shifting balance theory and macro evolution.

Annu. Rev. Genet. 16:1–19

WRIGHT J. S., TRABER K. E., CORRIGAN R., BENSON S. A., MUSSEY J. M., NOVICK R. P. (2005):

The *agr* radiation: an early event in the evolution of staphylococci.

J. Bacteriol. 187:5585–5594

WULF M. W., MARKESTEIN A., VAN DER LINDEN F. T. (2008):

First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital.

Euro. Surveill. 13(9):pi8051

WYLLIE D. H., CROOK D. W., PETO T. E. (2006):

Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997–2003: cohort study.

BMJ 333(7562):281

YAMADA A., TSUKAGOSHI N., UDAKA S., SASAKI T., MAKINO S., NAKAMURA S., LITTLE C., TOMITA M., IKEZAWA H. (1988):

Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus subtilis*.

Eur. J. Biochem. 175:213–220

YOKOYAMA, ET AL. (2012):

Staphylococcal superantigen-like protein-3 binds to the toll-like receptor-2 extracellular domain and inhibits cytokine production induced by *Staphylococcus aureus* cell wall component, or lipopeptides in murine macrophages.

Infect. Immun. 80(8):2816-2825

YU F., CHEN Z., LIU C., ZHANG X., LIN X., CHI S., ZHOU T., CHEN Z., CHEN X. (2008):

Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Pantón–Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China.

Clin. Microbiol. Infect. 14:377–397

ZHANG S., LANDOLO J. J., STEWART G.C. (1998):

The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej).

FEMS Microbiol. Lett. 168:227–233

ZWAMBAG A., FRIENDSHIP R., WEESE S., ROSENDAL T. (2009):

A longitudinal study of MRSA colonisation: Where and when do pigs become infected?

Proceedings zum 40. Jahrestreffen der American Association of Swine Veterinarians, 1:77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gattungsmerkmale von Staphylokokken (modifiziert nach Gatermann 2009).	4
Tabelle 2: Vergleich des normalen <i>S. aureus</i> Phänotyps mit dem SCV-Phänotyp (modifiziert nach Becker et Eiff, 2006).	8
Tabelle 3: Sequenzvariationen der sieben Housekeepinggenen (modifiziert nach Enright et al. 2000).	14
Tabelle 4: Wichtige Virulenzfaktoren (modifiziert nach Foster 2002).	27
Tabelle 5: Antibiotika und bekannte Resistenzgene von <i>S. aureus</i> .	46
Tabelle 6: Betriebsdaten der untersuchten Betriebe.	56
Tabelle 7: MRSA-Isolate aus Europa mit Herkunft.	58
Tabelle 8: Weitere kritische Einflussgrößen, die zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.	70
Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der entnommenen Proben in jedem untersuchten Betrieb (* in Betrieb 20 war ein entnommener Nasentupfer nicht mehr zu verwenden, daher nur 9 Isolate).	91
Tabelle 10: Anzahl der Nasentupferproben von Schweinen und Umgebungsproben mit MRSA pro Betrieb (Siehe auch Tabelle: 12).	93
Tabelle 11: Betriebe, in denen MRSA aus den Nasentupfern der untersuchten Landwirte isoliert werden konnten.	94
Tabelle 12: Intraherdenprävalenz bei Schweinen der untersuchten Betriebe.	96
Tabelle 13: Verteilung der Intraherdenprävalenzen von niedrig- zu hochprävalent.	97
Tabelle 14: Prävalenzen der unterschiedlichen beprobten Altersklassen ($p=0,001$).	98
Tabelle 15: Anzahl der entnommenen Nasentupfer bei beruflich in Schweinekontakt stehenden Menschen ($p=0,076$).	100
Tabelle 16: Anzahl der nasal mit MRSA-besiedelten Bauern in jedem Betrieb.	101
Tabelle 17: Umgebungsproben pro Betrieb, in denen MRSA nachgewiesen wurden, mit Gesamtanzahl, Prävalenz an positiven Umgebungsproben pro Betrieb und Ø Prävalenz.	104
Tabelle 18: Anzahl der MRSA-positiven Proben in Hessen, Baden-Württemberg, NRW und Niedersachsen.	106
Tabelle 19: MRSA-Prävalenz in den Betrieben der untersuchten Bundesländer.	107

Tabelle 20: Anzahl der Betriebe mit MRSA-kolonisierten Schweinen geordnet nach Betriebsart (p=0,926).	109
Tabelle 21: Ergebnisse des VITEK2.	112
Tabelle 22: ST/CC mit SCCmec Zuordnung der analysierten MRSA von Krankenhauspatienten und aus Schweinebeständen.	118
Tabelle 23: Genotyp der Schweine-MRSA-Isolate (p=0,034).	120
Tabelle 24: Genotyp der MRSA-Isolate von Landwirten, Tierärzten und Studenten.	121
Tabelle 25: Genotyp der Isolate von Umgebungsproben (p=0,237).	121
Tabelle 26: Isolate der MRSA der Krankenhauspatienten, eingeteilt nach Anzahl der kolonisierten und invasiv befallenen Patienten mit HA-, CA- und LA-Zuordnung.	125
Tabelle 27: MRSA-Isolate der Krankenhauspatienten geordnet nach <i>SCCmec</i> -Typ und Anzahl an Isolaten mit der entsprechenden <i>SCCmec</i> , sowie Isolate die dem CC398 zugeordnet werden können.	126
Tabelle 28: Vorkommen des PVL-Gens unter den analysierten Isolaten.	127
Tabelle 29: Anwesenheit des gamma-Hämolysin-Gens unter den analysierten Isolaten.	127
Tabelle 30: Vorkommen der Alpha-, Beta- und Delta-Hämolysin-Gen-positiven-MRSA-Isolate in Prozent.	128
Tabelle 31: Alpha-Hämolysin-Gen-negative Isolate geordnet nach CC und Herkunft.	129
Tabelle 32: Beta-Hämolysin-Gen-negative Isolate geordnet nach CC und Herkunft.	129
Tabelle 33: Vorkommen der <i>ccrA3</i> -, <i>ccrB3</i> -, <i>ccrC</i> -, <i>ccrA4</i> - und <i>ccrB4</i> -Gene unter den analysierten Isolaten in Prozent.	133
Tabelle 34: CC der <i>ccrC</i> -Gen-positiven Isolate (p<0,001).	134
Tabelle 35: Die Verteilung der <i>SCCmec</i> -Kassetten mit zugehörigen <i>ccr</i> -Genen und die daraus resultierende Einordnung in CA-, HA- und LA-MRSA.	134
Tabelle 36: Die CC der MRSA der Krankenhauspatienten mit dem <i>agr</i> -I-Gen.	135
Tabelle 37: Isolate des CC5 mit dem <i>agr</i> -II-Gen der MRSA von Krankenhauspatienten.	136
Tabelle 38: Das Vorkommen des Collagen-binding Adhesin-Gens bei den MRSA der untersuchten Gruppen.	139
Tabelle 39: Anzahl der <i>cna</i> -Gen-positiven und -negativen Isolate von Krankenhauspatienten geordnet nach CC.	140
Tabelle 40: Vorkommen des Potassium-transporting ATPase A-Gens.	141
Tabelle 41: Vorkommen des Potassium-transporting ATPase B-Gens.	141
Tabelle 42: Vorkommen der Gene des Immune-Evasion-Clusters.	144

Tabelle 43: Vorkommen des Fibrinogenbindungs-Protein-Gens.	145
Tabelle 44: Vorkommen des <i>sasG</i> -Gens ($p < 0,001$).	147
Tabelle 45: <i>SasG</i> -Gen-positive und -negative CC der Krankenhauspatienten.	148
Tabelle 46: Vorkommen der Enterotoxingene (in Prozent), bei den MRSA-Isolaten der untersuchten Gruppen.	149
Tabelle 47: Vorkommen der Staphylococcen-like Superantigen-Gene in Isolaten jeder untersuchten Gruppe (Vorkommen jedes Superantigens: $p < 0,001$).	151
Tabelle 48: Nachgewiesene Virulenzgene der fünf Isolate des CC398 von Krankenhauspatienten.	152
Tabelle 49: CC der MSSA-Isolate.	153
Tabelle 50: Virulenzgene der MSSA mit Herkunft der Isolate (in Klammern steht welche Herkunft die Isolate des CC hatten, die positiv waren, falls dies nicht bei allen Isolaten der Fall war).	154
Tabelle 51: Die Isolate aus dem Ausland (Spanien, Dänemark, Niederlande und Schweiz) mit Angabe der Herkunft, der Genotypisierung und der Virulenzgene (X=Gen ist vorhanden).	157
Tabelle 52: Resistenzen der Isolate von Schweinen, aus dem Ausland und Deutschland in Prozent.	158
Tabelle 53: Die beprobten Personen mit Schweinekontakt mit MRSA-Status und Angaben zum CC und der <i>SCC_{mec}</i> sowie zu ihren Antibiotikaeinnahmen in den letzten sechs Monaten.	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Model der metabolischen und energetischen Prozesse, die durch Menandion und Hämin gesteuert werden (modifiziert nach Proctor et al. 2006).	7
Abbildung 2: <i>SCCmec</i> Typen (nach Kondo et al. 2006).	11
Abbildung 3: Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten, die durch Multiplex-PCR entstanden sind.	13
Abbildung 4: Aktivität der S- und F-Komponenten von SHT in der Zellmembran von PMNs (nach Staali et al. 1998).	19
Abbildung 5: CA-MRSA Verbreitung und ST (modifiziert nach De Leo et al. 2010).	30
Abbildung 6: ST398 und andere weltweit bei Schweinen isolierte ST (modifiziert nach Pantosti et al. 2012).	32
Abbildung 7: <i>Spa</i> -Typ t011 und verwandte Subtypen (nach Reischl et al. 2009).	34
Abbildung 8: Anpassung der MRSA (modifiziert nach Baquero et al. 2012).	36
Abbildung 9: Verwandtschaft verschiedener LA-MRSA Stämme (nach Fitzgerald et al. 2012).	37
Abbildung 10: Lage und Anzahl der untersuchten Betriebe in Deutschland, sortiert nach Bundesländern.	57
Abbildung 11: Herkunft der europäischen porcinen MRSA-Isolate.	59
Abbildung 12: Das Laborgefäß (Fa. Greiner bio-one) wurde bis zur Markierung mit Staub gefüllt.	61
Abbildung 13: Herkunft der MRSA-Isolate.	63
Abbildung 14: Unbeimpftes CASO-Röhrchen (links) und beimpfte, bebrütete getrübbte CASO-Bouillon mit Bakterienwachstum (rechts).	64
Abbildung 15: Mit CASO-Bouillon aufgefülltes steriles Glasgefäß mit Sockentupfer (links) und Staubröhrchen mit CASO-Bouillon (rechts).	65
Abbildung 16: COS-Agar mit Aztreonam.	67
Abbildung 17: Pastorex-Staph-Plus Test mit Agglutination (obere Reihe) und Negativkontrolle (untere Reihe).	69
Abbildung 18: Anzucht, bakteriologische Untersuchung und molekularbiologische Differenzierung.	71
Abbildung 19: Skim-Milk Röhrchen zur Konservierung der MRSA.	72
Abbildung 20: Metalltarget des MALDI-TOF.	73

Abbildung 21: Benennung jedes MALDI-TOF Durchlaufes und Zuordnung jedes Isolates zu dem beimpften Target Spot.	74
Abbildung 22: Ergebnisse des MALDI-TOF.	75
Abbildung 23: Ergebnisse des Vitek2.	77
Abbildung 24: Die Genabschnitte <i>mecA</i> , <i>femB</i> und <i>nuc</i> .	78
Abbildung 25: Primer.	80
Abbildung 26: Amplifikationskurven des <i>mecA</i> - (FAM-Kanal) und des <i>femB</i> -Gens (TET-Kanal).	82
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Microarray Analyse (nach Monecke et al. 2008).	83
Abbildung 28: Aktive Flächen eines DNA-Arrays (nach Monecke et al. 2008).	87
Abbildung 29: Microarray Protokoll (Ausschnitt).	88
Abbildung 30: Entnommene Proben in den einzelnen Betrieben.	90
Abbildung 31: Anzahl der entnommenen Proben mit geographischer Verteilung.	92
Abbildung 32: MRSA-positive Proben in den untersuchten Betrieben.	95
Abbildung 33: Anzahl der untersuchten Schweine, eingeteilt nach Altersklassen in Prozent.	97
Abbildung 34: Anzahl MRSA-positiver und -negativer Landwirte, Tierärzte und Tiermedizinstudenten.	99
Abbildung 35: Anteil der entnommenen Umgebungsproben in Prozent.	102
Abbildung 36: Anzahl MRSA-positiver und negativer Umgebungsproben aufgeteilt nach Ketten, Tränken, Socken und Staub ($p=0,379$).	103
Abbildung 37: Anzahl der entnommenen Nasentupferproben von Schweinen, Landwirten, Tierärzten und Studenten sowie Umgebungsproben je Bundesland.	105
Abbildung 38: Anzahl der untersuchten Betriebe unterschiedlicher Betriebsstruktur.	108
Abbildung 39: Antibiotikagaben in Prozent in den untersuchten Betrieben.	110
Abbildung 40: MRSA-positive und negative Betriebe, ermittelt durch den MRSA-Status ihrer Schweine und eingeteilt nach Antibiotikagaben.	111
Abbildung 41: Ausgewählte humane MRSA-Isolate zum späteren Vergleich mit den MRSA-Isolaten aus Schweinebetrieben.	113
Abbildung 42: MRSA-Isolate, die mit dem Microarray untersucht wurden in Prozent.	114
Abbildung 43: CC der untersuchten Isolate.	116
Abbildung 44: Identifizierte CC mit <i>SCCmec</i> der porcinen MRSA in Prozent.	119
Abbildung 45: CC der MRSA der Krankenhauspatienten in Prozent ($p=0,28$).	122
Abbildung 46: Anzahl der MRSA-Isolate mit dem <i>ccrA1</i> -, <i>ccrB1</i> -, <i>ccrA2</i> - und <i>ccrB2</i> -Gen.	132

Abbildung 47: Das Vorkommen der <i>agr</i> -I–IV-Gene unter den untersuchten Gruppen.	138
Abbildung 48: Die CC der <i>cna</i> -Gen-positiven MRSA-Isolate der Krankenhauspatienten.	139
Abbildung 49: Das Leukozidin D- und E-Gen Vorkommen bei den MRSA der untersuchten Gruppen ($p < 0,001$).	142
Abbildung 50: ST der Leukocidin E-Gen positiven Krankenhauspatienten.	143
Abbildung 51: Vorkommen des Fibrinogen bindenden Protein-A und –B-Gens ($p < 0,001$).	146
Abbildung 52: Vergleichende Darstellung der Virulenzgene des ST398 mit anderen ST von MRSA der untersuchten Krankenhauspatienten.	190
Abbildung 53: Übertragung neuer Virulenzgene von HA- und CA-MRSA im Krankenhaus auf MRSA des ST398 von schweineassoziierten Personen die keinem Aufnahmescreening unterzogen wurden.	193

Anhang

Fragebogen Nr.:.....

MRSA Fragebogen für Tierärzte und Studenten:

Beruf:

☐ Tierarzt

☐ Student

☐ Rotationsstudent

☐ Famulant

Wann hatten Sie Kontakt zu Schweinen?

☐ Nur im Rahmen der Rotation in der Schweineklinik

☐ Ich besitze eigene Schweine

Häufigkeit des Kontakts mit Schweinen:

☐ mehrmals täglich ☐ täglich ☐ wöchentlich ☐ seltener

Alter der beprobten Person in Jahren:

☐ 0-10 ☐ 11-20 ☐ 21-30 ☐ 31-40 ☐ 41-50 ☐ 51-60 ☐ 61-70 ☐ 71-80 ☐ 81-90 ☐ 91-100

Haben Sie selbst in den letzten 6 Monaten Antibiotika eingenommen?

☐ Ja ☐ Nein

Welche Antibiotika?:

☐ Penicillin

☐ Amoxicillin

☐ Amoxicillin+ Clavulansäure

☐ Clindamycin

☐ Tetracyclin

☐ Andere_____

Warum?

☐ Wunden ☐ OP ☐ Husten ☐ Lungenentzündung ☐ Schnupfen

☐ Andere_____

Wie lange haben Sie Antibiotika eingenommen?

☐ 3-5 Tage ☐ 5-10 Tage ☐ länger als 10 Tage ☐ länger als 4 Wochen

Behandlungserfolg der Antibiotikaeinnahme:

☐ sehr gut ☐ gut ☐ mäßig ☐ schlecht

Liegen bei Ihnen selbst Erkrankungen vor?

- ☐ Hauterkrankungen
- ☐ Schlecht heilende Wunden
- ☐ „Offene Beine“
- ☐ Lungenprobleme/ Atemwegsprobleme
- ☐ Chronischer Husten
- ☐ Chronischer Schnupfen
- ☐ Chronische Nasennebenhöhlenentzündung
- ☐ Entzündung des Herzens
- ☐ Augenentzündungen
- ☐ Andere

Seit wann liegen diese Erkrankungen vor?

- ☐ 1 Monat ☐ 2 Monaten ☐ länger als 2 Monate ☐ länger als 6 Monate

Lag bei Ihnen ein Krankenhausaufenthalt in den letzten 6 Monaten vor?

- ☐ Ja ☐ Nein

Hat bei Ihnen eine Operation stattgefunden?

- ☐ Ja ☐ Nein

Wenn Ja: kam es zu

- ☐ Wundheilungsstörungen ☐ Infektionen

Hatten Sie in den letzten 6 Monaten Kontakt zu Personen im

- ☐ Krankenhaus
☐ Altersheim

Arbeiten Sie in einer/ einem

- ☐ Zahnarztpraxis
☐ Tierarztpraxis
☐ Altersheim
☐ Krankenhaus

Haben Sie wissentlich Kontakt zu einer Person mit MRSA?

- ☐ Ja ☐ Nein

☐ Hiermit stimme ich der anonymen Auswertung meiner Daten/ Proben zu

Altersklassen

Bezeichnung	Alter	Gewicht
Ferkel	1-4 Wochen	1,2-10 kg
Absetzer/Absetzer zur Mast	4-12 Wochen	10-30kg
Mastschwein	12-30 Wochen	30-125kg
Sau	>7Mo	>125kg
Eber	>1 Jahr	>180kg

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Reiner und Prof. Frank für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und ihrer Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Dissertation bedanken.

Prof. Frank möchte ich des Weiteren für die Bereitstellung des Labors und Materials in der Sektion Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Heidelberg danken und Prof. Reiner für die Auswahl der Betriebe. Besonders möchte ich mich bei Dr. Nico Mutters für die Hilfe bei der Laborarbeit und der Datenanalyse und Planung meiner Dissertation bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit möchte ich mich ganz herzlich beim Team der Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Heidelberg bedanken. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Schweineklinik in Gießen sowie der Tierklinik Dr. Willms-Schulze Kump für die Hilfe bei der Probenentnahme und der Auswahl der Betriebe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den teilnehmenden Landwirten ohne deren Hilfe diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Für die tatkräftige Unterstützung und das Korrekturlesen möchte ich Christine Koch danken.

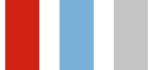
Mein größter Dank gilt meinen Eltern ohne deren Unterstützung ich niemals so weit gekommen wäre!

Ich danke ganz herzlich der Hanns-Seidel Stiftung für die finanzielle und ideelle Förderung im Rahmen des Promotionsstipendiums während meiner Dissertation.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Püttlingen, den 23.05.2014



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6293-4



9 17 8 3 8 3 5 11 9 6 2 9 3 4 1

